

#14
Priority
Document

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE



In re Patent Application of

Hiroshi SANO et al.

Application No.: 09/971,020

Filed: October 5, 2001

For: THEOBROMINE SYNTHASE
POLYPEPTIDE OF COFFEE PLANT
AND THE GENE ENCODING SAID
POLYPEPTIDE

)
)
) Group Art Unit: 1638
)
) Examiner: Ashwin D. Mehta
)
) Confirmation No.: 3752
)
)
)
)
)

CLAIM FOR CONVENTION PRIORITY

Assistant Commissioner for Patents
Washington, D.C. 20231

Sir:

The benefit of the filing date of the following prior foreign Application in the following foreign country is hereby requested, and the right of priority provided in 35 U.S.C. § 119 is hereby claimed:

Japan Patent Application No. 2000-307,149

Filed: October 6, 2000

In support of this claim, enclosed is a certified copy of said prior foreign application. Said prior foreign application was referred to in the oath or declaration. Acknowledgment of receipt of the certified copy is requested.

Respectfully submitted,

BURNS, DOANE, SWECKER & MATHIS, L.L.P.

Date: January 24, 2003

By:
Erin M. Dunston
Registration No. 51,147

P.O. Box 1404
Alexandria, Virginia 22313-1404
(703) 836-6620



PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

This is to certify that the annexed is a true copy
of the following application as filed with this Office.

Date of Application : October 6, 2000

Application Number : Japanese Patent Application
No. 2000-307149

Applicant(s) : President of
NARA INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY

Certified on June 29, 2001

Commissioner,
Patent Office

Kozo OIKAWA (Sealed)

Certification No. 2001-3061410

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

This is to certify that the annexed is a true copy
of the following application as filed with this Office.

Date of Application : October 6, 2000

Application Number : Japanese Patent Application
No. 2000-307149

Applicant(s) : President of
NARA INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY

Certified on June 29, 2001

Commissioner,
Patent Office Kozo OIKAWA (Sealed)

Certification No. 2001-3061410

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日

Date of Application:

2000年10月 6日

出 願 番 号

Application Number:

特願2000-307149

出 願 人

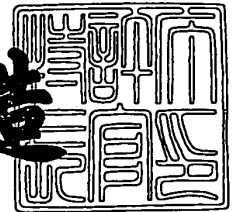
Applicant(s):

奈良先端科学技術大学院大学長

2001年 6月29日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Japan Patent Office

及 川 耕 造



出証番号 出証特2001-3061410



【書類名】 特許願

【整理番号】 2000P095

【提出日】 平成12年10月 6日

【あて先】 特許庁長官 及川 耕造 殿

【国際特許分類】 A01H 3/00
C12N 15/00

【発明の名称】 コーヒー属植物のテオブロミン合成酵素ポリペプチド及び当該ポリペプチドをコードする遺伝子

【請求項の数】 8

【発明者】

【住所又は居所】 奈良県生駒市鹿ノ台西2-7-15

【氏名】 佐野 浩

【発明者】

【住所又は居所】 奈良県奈良市富雄元町2-7-12-203

【氏名】 草野 友延

【発明者】

【住所又は居所】 奈良県生駒市高山町8916-5 C505

【氏名】 小泉 望

【特許出願人】

【識別番号】 598169457

【氏名又は名称】 奈良先端科学技術大学院大学長 山田 康之

【代理人】

【識別番号】 100072051

【弁理士】

【氏名又は名称】 杉村 興作

【選任した代理人】

【識別番号】 100059258

【弁理士】

【氏名又は名称】 杉村 暁秀

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9900570

【書類名】 明細書

【発明の名称】 コーヒー属植物のテオブロミン合成酵素ポリペプチド及び当該ポリペプチドをコードする遺伝子

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 以下の (a) または (b) に示すアミノ酸配列からなることを特徴とする、ポリペプチド。

(a) 配列表の配列番号 1 に示す、アミノ酸番号 1 - 3 7 8 で示されるアミノ酸配列からなることを特徴とする、ポリペプチド。

(b) 7-メチルキサンチンを基質としてテオブロミンを生合成する活性を有し、(a) のアミノ酸の一部が欠失、置換若しくは付加された、ポリペプチド。

【請求項 2】 請求項 1 記載のポリペプチドをコードする、遺伝子。

【請求項 3】 以下の (c) または (d) に示す塩基配列からなることを特徴とする、遺伝子。

(c) 配列表の配列番号 2 に示す、塩基番号 1 - 1 2 9 8 で示される塩基配列からなることを特徴とする、遺伝子。

(d) 7-メチルキサンチンを基質としてテオブロミンを生合成する活性を有するポリペプチドをコードし、(c) の塩基配列の一部が欠失、置換若しくは付加された、遺伝子。

【請求項 4】 請求項 2 又は 3 記載の遺伝子の発現を抑制することにより、テオブロミンの生合成量が低下した、形質転換植物。

【請求項 5】 請求項 4 記載の形質転換植物より採取した種子。

【請求項 6】 請求項 2 又は 3 記載の遺伝子を導入することにより、テオブロミンの生合成量が増加した、形質転換植物。

【請求項 7】 請求項 6 記載の形質転換植物より採取した種子。

【請求項 8】 請求項 2 又 3 記載の遺伝子の発現を抑制することにより、テオブロミンの生合成量が低下した形質転換植物を作製する方法。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明は、テオブロミン合成酵素のポリペプチド及び当該酵素をコードする遺伝子に関する。

【0002】

【従来の技術】

コーヒーは、世界の至るところで愛好されている飲料であり、その有用性は非常に大きい。一方、コーヒーに含まれているカフェインは、コーヒーを過剰に摂取した場合に害を及ぼす原因となる物質である。カフェインはキサンチン誘導体の一種であり、キサンチン誘導体にはカフェインの他にテオフィリン、テオブロミンが含まれる。これらキサンチン誘導体は、ホスホジエステラーゼを阻害してcAMP量を増加させる事により、中枢興奮作用及び循環機能の亢進作用を有する事が知られている。キサンチン誘導体が有するこの様な作用は、適量の摂取では精神の高揚など有用に働くが、上述した様に過剰量では有害となるために、カフェインレスコーヒーが世の中で広く求められていた。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】

カフェインレスコーヒーを得るためにカフェインの生合成を人為的に抑制する目的で、キサンチン誘導体の生合成に関与する遺伝子の採取が試みられてきた。図1 (Advances in Botanical Research, Vol.30, Academic Press (1999) p149より掲載) に、コーヒー属植物におけるカフェイン生合成の経路を示す。図1において、実線の矢印はカフェイン合成の主要経路を、点線の矢印はカフェイン合成のマイナーな経路を、それぞれ示す。図1の2段目に示される様に、キサントシンから7-メチルキサントシン、テオブロミンを経由してカフェインを生成する生合成経路が知られており、この経路はコーヒー属植物におけるカフェイン生合成の主要経路である。このカフェインの主要生合成経路の後半は3段階のN-メチル化反応であり、これらのN-メチル化反応はS-アデノシルメチオニン依存的反応である事が知られている。7-メチルキサントシンからパラキサントシンを経由してカフェインを生合成する経路(図1の3段目)も存在しているが、この経路の寄与は大きなものではない。7-メチルキサントシンを合成する最初のメチル化反応については、当該反応を担う酵素の遺伝子が採取され、既に報告されて

いる（国際公開番号 WO 97/35960）。しかし、第2段階、第3段階のメチル化反応に関与する遺伝子は、まだ知られていなかった。効率的かつ確実に、カフェインの生合成経路を操作するには、カフェイン生合成に関与する酵素の遺伝子について、より多くの知見を得る必要がある。

【0004】

【課題を解決するための手段】

そこで、本発明者らはカフェインの生合成において、テオブロミンの生合成を担っている第2段階のメチル化反応に関与する酵素に注目し、当該酵素をコードする遺伝子の採取を行った。当該酵素は7-メチルキサンチンからテオブロミンを生合成する反応を触媒する酵素であるために、当該酵素の遺伝子の発現を抑制すると、テオブロミンの生合成が抑制される。カフェインの生合成経路において、テオブロミンのN-メチル化反応によりカフェインが生成するために、テオブロミンの生合成が抑制されると、カフェインの生合成もまた抑制される。上述した様に、テオブロミンとカフェインとは共にキサンチン誘導体として類似の薬理作用を有するために、テオブロミンとカフェインの両者の生合成を同時に操作できる酵素の遺伝子を採取する事には大きな意義がある。即ち、第3段階のメチル化反応に関与し、カフェインの最終的な生合成に関与する酵素をコードする遺伝子を採取してその発現を抑制すると、カフェインの生合成は抑制されるがテオブロミン量は減少せず、代謝が抑制される為に逆にテオブロミンが蓄積されることが考えられる。よってテオブロミンがカフェインと類似の薬理活性を有している事を考えると、テオブロミン合成酵素の遺伝子を採取した本発明の効果は大きいと考えられる。

【0005】

【発明の実施の形態】

本発明は、配列表の配列番号2に示す、塩基番号1-1298で示される塩基配列からなることを特徴とする、コーヒーアラビカ (*Coffea arabica*) 由来のテオブロミン合成酵素遺伝子である。テオブロミン合成酵素は上述したように、コーヒー属植物において、7-メチルキサンチンを基質としてテオブロミンを合成する、メチル化反応を触媒する酵素である。配列表の配列番号2記載の塩基配列

で示される遺伝子は、その様なテオブロミン合成酵素をコードする遺伝子である。

【0006】

遺伝子組み換え技術によれば、基本となるDNAの特定の部位に、当該DNAの基本的な特性を変化させることなく、あるいはその特性を改善する様に、人為的に変異を起こすことができる。本発明により提供される天然の塩基配列を有する遺伝子、あるいは天然のものとは異なる塩基配列を有する遺伝子に関しても、同様に人為的に挿入、欠失、置換を行う事により、天然の遺伝子と同等のあるいは改善された特性を有するものとする事が可能であり、本発明はそのような変異遺伝子を含むものである。即ち、配列表の配列番号2に示す遺伝子の一部が欠失、置換若しくは付加された遺伝子とは、配列番号2に示す塩基配列において10個以下、好ましくは7個以下、更に好ましくは3個以下の塩基が欠失、置換若しくは付加された配列を有する遺伝子である。また、その様な遺伝子は、配列表の配列番号1に示す遺伝子と90%以上、好ましくは95%以上、更に好ましくは99%以上の相同性を有する。また、その様な遺伝子は、ストリンジェントな条件下で、配列表の配列番号2に示す遺伝子とハイブリッドを形成する。その様な遺伝子も、7-メチルキサンチンを基質としてテオブロミンを生合成する、テオブロミン合成酵素の特徴を有するポリペプチドをコードする限り、本発明の範囲内である。

【0007】

更に本発明は、配列表の配列番号1に示す、アミノ酸番号1-378で示されるアミノ酸配列からなることを特徴とする、コーヒーアラビカ (*Coffea arabica*) 由来のテオブロミン合成酵素のポリペプチドである。配列番号1に示すポリペプチドの一部が欠失、置換若しくは付加されたポリペプチドとは、配列番号1に示すアミノ酸配列において10個以下、好ましくは7個以下、更に好ましくは3個以下のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加された配列を有するポリペプチドである。また、その様なポリペプチドは、配列表の配列番号1に示すポリペプチドと90%以上、好ましくは95%以上、更に好ましくは99%以上の相同性を有する。その様なポリペプチドも、7-メチルキサンチンを基質としてテオブロミ

ンを合成するというテオブロミン合成酵素の特徴を有する限り、本発明の範囲内である。尚、配列表の配列番号 3、配列番号 5、配列番号 7 に示すポリペプチドは、コーヒーアラビカ (*Coffea arabica*) から得られ、配列表の配列番号 1 のアミノ酸配列と 80% の相同性を有するポリペプチドである。これら 3 つのポリペプチドは、配列表の配列番号 1 と高い相同性を有しているにも関わらず、テオブロミン合成酵素活性を示さなかった。

【0008】

配列表の配列番号 2 記載のテオブロミン合成酵素遺伝子の発現を抑制し、テオブロミンの生合成量を低下させた形質転換植物もまた、本発明の範囲内である。本発明のテオブロミン合成酵素遺伝子は、上述した様にコーヒーアラビカのテオブロミン生合成に関与する酵素をコードする遺伝子である。よって本発明の遺伝子の発現を抑制することにより、植物においてテオブロミンの生合成を抑制して、植物においてテオブロミンとカフェインの含量を低下させることが可能である。本発明のテオブロミン合成酵素遺伝子の発現を抑制する植物としては、コーヒーアラビカ (*Coffea arabica*)、コーヒーカネフォラ (*Coffea canephora*)、コーヒーリベリカ (*Coffea liberica*) 及びコーヒーデウエブレイ (*Coffea dewevrei*) 等のコーヒー属植物が挙げられる。

【0009】

それらの植物において、本発明の遺伝子の発現を抑制する事により、テオブロミンとカフェインの生合成を抑制することができる。遺伝子の発現を抑制する手段として、本発明の遺伝子のアンチセンス遺伝子を導入する方法を用いることができる。アンチセンス遺伝子とは、ある遺伝子を構成している DNA の転写産物である mRNA と、相補的な塩基配列を発現する遺伝子である。アンチセンス遺伝子の転写産物は、本来の mRNA と相補性を有するために、アンチセンス遺伝子は翻訳段階で遺伝子発現を抑制する。この技術を利用することにより、テオブロミン合成酵素遺伝子の発現を抑制することが可能である。

【0010】

その他にも、遺伝子発現抑制の方法がいくつか知られている。目的遺伝子の遺伝子破壊により、目的遺伝子の発現を抑制する事ができる。また、植物において

は、センス遺伝子を導入して過剰発現しても遺伝子干渉現象により目的遺伝子の発現が抑制される、というコサプレッション技術（トランスウィッチ技術）が知られており、その様な方法を用いても目的遺伝子の発現を抑制することができる。また、二本鎖RNAを用いるDouble-stranded RNA interference (RNAi) 法が遺伝子発現の抑制に有効であることが、近年言われてきている (Chiou-Fen Chuang et al. PNAS (2000) vol.97,4985-4990)。二本鎖RNAは配列特異的に遺伝子発現を抑えるということが、線虫やショウジョウバエを中心に明らかにされてきた。この様な二本鎖RNAを用いる方法がRNAi法であり、本方法が線虫やショウジョウバエのみならず、シロイヌナズナ等の植物でも有効であることが最近示されてきている。RNAi法により遺伝子発現が抑制される機構はまだ知られていないが、本法は上記のアンチセンス法に比べて効率良く遺伝子発現を抑制することができると言われている。

【0011】

ところで、カフェイン、テオブロミン等のプリンアルカロイドは、昆虫忌避作用があり、それが植物にとってのプリンアルカロイドの意義であると考えられている。そこで、本発明の遺伝子を導入してテオブロミンの生合成を促進させる事により、昆虫忌避活性を有する植物体を作製することができる。本発明の酵素が、7-メチルキサンチンを基質としてテオブロミンを生合成する活性を担っていることを考えると、前述の7-メチルキサンチンを合成する酵素の遺伝子（国際公開番号 WO 97/35960）と共に本発明の遺伝子を植物に導入することは、特に有効であると思われる。7-メチルキサンチンを合成する酵素の活性が促進されると、本発明の酵素の基質が増加して、目的産物であるテオブロミンの蓄積が期待される。

【0012】

形質転換体の作製方法としては、本技術分野において知られている通常の方法を用いる事ができる。本発明において使用可能なベクターはプラスミドベクターであり、例えばpBI121等が挙げられるが、それらに限定されるものではない。そのようなベクターを、例えばアグロバクテリウム菌に導入して、カルス又は幼植物に感染させることにより、形質転換植物を作製する事が可能であり、更に、そ

のような形質転換植物に由来する種子を得る事が可能である。本発明者らは特開 2000-245485 において、コーヒー属植物の胚発生カルスをアグロバクテリウムツメファシエンスEHA101に感染させることにより、高い効率で形質転換できる方法を報告しており、特開2000-245485 に記載した形質転換方法は特に有用であると思われる。

【0013】

【実施例】

(PCR による増幅)

一対のディジェネレート・オリゴヌクレオチド (Forward プライマー, GGITGYDSIDSIGGICCAAYAC; Reverse プライマー, ARIYKIYYRTRRAAISWICCIGG) を、TC S1 (Kato et al 2000, GenBank accession no. AB031280) と2つのシロイヌナズナの機能未知のタンパク質 (Z99708及びAC008153) の間で保存された領域に基づいて合成した。これらのオリゴヌクレオチドは、GC(A/S)(A/S)GPNTと、PGSF(H/Y)(G/K)(R/N)LF というアミノ酸配列に、それぞれ相当する。コーヒー・アラビカ (*Coffea arabica*) のcDNA及び上記の1組のプライマーを含む25 μ l の反応混合液中で、以下の条件下でPCRを行った。即ち、94℃で1分間反応した後、94℃で30秒間の変性反応、52℃で30秒間のアニーリング、72℃で1分間の伸長反応の繰り返しを30サイクル行い、更に72℃で7分間の最終伸長反応を行うという条件で、PCRを行った。増幅された約270塩基対のcDNA断片を用いて、cDNAライブラリーのスクリーニングに使用した。

【0014】

(cDNAライブラリーの構築および目的cDNAのスクリーニング)

コーヒー (*Coffea arabica*) の若い葉から全RNAを抽出し、oligo-dTカラム (Pharmacia) によりmRNAに精製した。ZAPII cDNA synthesis kit (Stratagene) を用いてmRNAからcDNAを合成し、 λ ZAPII ベクターへ導入し、ファージライブラリーを作製した。上記の増幅された断片をプローブにcDNAライブラリーをスクリーニングした。得られたポジティブブランクをランダムに35ヶ選択し、プラスミドに変換した後、物理地図および部分シーケンシングを行ったところ、これらは4つの独立したクローンに帰属することが明らかとなった。

【0015】

それぞれの代表であり、もっとも全長cDNAに近いクローン#1、#6、#35および#45につき、その塩基配列を決定した。また、その塩基配列のオープンリーディングフレームによりコードされる、推定アミノ酸配列を決定した。図2に、シーケンシングを行った遺伝子配列を示す。クローン#45について得られたcDNAの塩基配列を、配列表の配列番号2及び図2Dに示す。当該遺伝子のオープンリーディングフレームは塩基番号32-1168であり、その領域によりコードされる推定アミノ酸配列を、配列表の配列番号1に示す。また、クローン#1について得られたcDNAの塩基配列を、配列表の配列番号4及び図2Aに示す。当該遺伝子のオープンリーディングフレームは塩基番号14-1171であり、その領域によりコードされる推定アミノ酸配列を、配列表の配列番号3に示す。また、クローン#6について得られたcDNAの塩基配列を、配列表の配列番号6及び図2Bに示す。当該遺伝子のオープンリーディングフレームは塩基番号44-1201であり、その領域によりコードされる推定アミノ酸配列を、配列表の配列番号5に示す。また、クローン#35について得られたcDNAの塩基配列を、配列表の配列番号8及び図2Cに示す。当該遺伝子のオープンリーディングフレームは塩基番号45-1163であり、その領域によりコードされる推定アミノ酸配列を、配列表の配列番号7に示す。以下、クローン#45をMXMT1と、クローン#1をMTL1と、クローン#6をMTL2と、クローン#35をMTL3と、遺伝子をそれぞれ命名した。

【0016】

MXMT1、MTL1、MTL2、及びMTL3がコードするアミノ酸配列のアラインメントを比較した結果を、図3に示す。その結果、これら4つの配列の相同性が非常に高い事が示された。これらのポリペプチドの機能を確認するために、対応するクローンの遺伝子を大腸菌で発現させて、酵素活性の確認を行った。

【0017】

(GST 融合タンパク質の発現)

MTL1(クローン#1)、MTL2(クローン#6)、MTL3(クローン#35)およびMXMT1(クローン#45)のオープンリーディングフレームを含む領域をPCR(

polymerase chain reaction)で増幅し、それらをpGEX 4T-2 ベクター (Pharmacia) へ適宜クローニングし、大腸菌 (JM109) を形質転換した。得られた大腸菌をアンピシリンを含むLB液体培地で培養後、OD600 が0.5 に達した後、終濃度が1mM になるようにIPTG (isopropyl thio- β -D-galactoside) を加え、さらに16℃で6時間培養した。大腸菌を超音波破碎し、グルタチオン・セファロース4Bを用いてGST (glutathione S-transferase) 融合タンパク質として精製した。タンパク質濃度はBradford法により測定した。各GST 融合タンパク質 (500 ng) をSDS-PAGE (ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動) で分離した後にCBB (クマシーブリリアンドブルー) 染色をおこない、精製されたことを確認した。得られたGST 融合タンパク質につき、SDS-PAGEにより純度を解析した結果を図4に示す。図4において、レーン1はMTL2由来の融合蛋白質を、レーン2はMTL3由来の融合蛋白質を、レーン3はMXMT1 由来の融合蛋白質をそれぞれ示す。その結果、得られた3つの融合蛋白質はほぼ純粋であることが示された。

【0018】

(薄層クロマトグラフによる酵素活性の測定)

薄層クロマトグラフ (TLC) により、酵素活性の測定を行った。加藤ら (Plant Physiol., 1996, 98, 629-636) の方法に基づき、酵素活性の測定を行った。具体的には 100 μ l の反応液 (100 mM Tris-HCl (pH7.5)、200 μ M の基質 (キサンチン、7-メチルキサンチン、テオブロミン、パラキサンチン、テオフォリン)、4 μ M 14 C 標識S-アデノシルメチオニン、200 μ M MgCl_2 、200 ng GST 融合タンパク質) を27℃で2時間反応後、1 mlのクロロホルムで抽出し、クロロホルム層を回収し、スピードバックコンセンレーターでクロロホルムをとばした。5 μ l の50% メタノールに溶解後、TLC で展開した (展開溶媒は水:酢酸:n-ブタノール=2:1:4、v/v/v)。展開後、画像解析装置 (FujiBAS2000) で放射能シグナルを検出した。キサンチン (X)、7-メチルキサンチン (7-Mx)、テオブロミン (Tb)、パラキサンチン (Px)、テオフォリン (Tp) を基質として、MTL2、MTL3及びMXMT1 由来の融合蛋白質の酵素活性を測定した結果を、図5に示す。図5よりMXMT1 由来の融合蛋白質は、7-メチルキサンチンを基質としてテオブロミンを合成する強力な活性を有していた。MXMT1 由来の融合蛋白質は

、パラキサンチンを基質としてカフェインを合成する活性も有していたが、その相対活性は前述の活性の15%であった。一方、MTL2及びMTL3由来の融合蛋白質は、上記の化合物を基質として用いてメチル基転移活性を示すことはなかった。

【0019】

(高速液体クロマトグラフによる酵素活性の測定と生産物の同定)

高速液体クロマトグラフ (HPLC) により、MXMT1 の融合蛋白質の酵素活性の測定と、酵素反応による酵素反応生産物の同定を行った。100 μ l の反応液 (100mM Tris-HCl (pH7.5)、200 μ M の基質 (7-メチルキサンチン、パラキサンチン、テオブロミン)、50 μ M S-アデノシルメチオニン、200 μ M $MgCl_2$ 、200ng GST融合タンパク質) を27°Cで2時間インキュベート後、1 mlのクロロホルムで抽出し、クロロホルム層を回収し、スピードバックコンセンレーターでクロロホルムをとばした。50 μ l の12% アセトニトリルに溶解後、UV検出系を備えたHPLC (Shodex RSpak DS-613 column) で分画した。展開溶媒は12% のアセトニトリルを用い、 A_{254} でシグナルを検出した。

【0020】

その結果を、図6に示す。図6Aは、MXMT1 の融合蛋白質を、S-アデノシルメチオニンと7-メチルキサンチンを基質と反応させ、その反応産物をHPLCで解析したチャートである。図6Bは、標品としてテオブロミンをHPLCで解析したチャートである。図6Cは、ネガティブコントロールとして、MXMT1 の融合蛋白質、S-アデノシルメチオニン、7-メチルキサンチンを混合した後にすぐに反応を止め、その混合液をHPLCで解析したチャートである。図6Dは、標品として、7-メチルキサンチン、テオブロミン、パラキサンチン、カフェインをHPLCで解析したチャートである。図6Eは、S-アデノシルメチオニンと7-メチルキサンチンをMXMT1 の融合蛋白質と反応させた反応液に、テオブロミンを添加してHPLCで解析したチャートである。図6Aで検出された反応生成物のピーク位置は、標品として加えたテオブロミンの位置と一致し、また酵素反応液にテオブロミンを添加しても1つのピークしか検出されなかったことから、MXMT1 の融合蛋白質の酵素反応により、7-メチルキサンチンを基質としてテオブロミンが生成する事が示された。

【0021】

【発明の効果】

本発明により、コーヒーアラビカにおけるテオブロミン合成酵素のポリペプチド及び当該ポリペプチドをコードする遺伝子が与えられた。テオブロミン合成酵素はカフェインの生合成に関与する酵素であり、当該酵素の遺伝子発現を抑制した形質転換植物を作製することにより、カフェインレスコーヒーを得ることができる。

【0022】

【配列表】

<110>出願人氏名：奈良先端化学技術大学院大学長

<120>発明の名称：コーヒー属植物のテオブロミン合成酵素ポリペプチド及び当該ポリペプチドをコードする遺伝子

<160>配列の数：8

<210>配列番号：1

<211>配列の長さ：378

<212>配列の型：アミノ酸

<213>起源：Coffea arabica

<400>配列

MELQEVLMN EGEDTSYAK NASYNLALAK VKPFLEQCIR ELLRANLPNI NKCIKVADLG	60
CASGPNTLLT VRDIVQSIDK VGQEEKNELE RPTIQIFLND LFQNDFNSVF KLLPSFYRKL	120
EKENGRKIGS CLISAMPGSF YGRLFPEESM HFLHSCYSVH WLSQVPSGLV IELGIGANKG	180
SIYSSKGRCP PVQKAYLDQF TKDFTTFLRI HSKELFSRGR MLLTCICKVD EFDEPNPLDL	240
LDMAINDLIV EGLLEEEKLD SFNIPFFTPS AEEVKCIVEE EGSCEILYLE TFKAHYDAAF	300
SIDDDYPVRS HEQIKAHEYVA SLIRSVYEPI LASHFGEAIM PDLFHLAKH AAKVLHMGKG	360
CYNNLIISLA KKPEKSDV	378

< 2 1 0 > 配列番号 : 2

< 2 1 1 > 配列の長さ : 1 2 9 8

< 2 1 2 > 配列の型 : 核酸

< 2 1 3 > 起源 : *Coffea arabica*

< 4 0 0 > 配列

```

AGCAGTCGCA ATTTCGATTGT CCTGCATATG AATGGAGCTC CAAGAAGTCC TGCATATGAA 60
TGAAGGTGAA GCGGATACAA GCTACGCCAA GAATGCATCC TACAATCTGG CTCTTGCCAA 120
GGTGAAACCT TTCCTTGAAC AATGCATACG AGAATTGTTG CGGGCCAACT TGCCCAACAT 180
CAACAAGTGC ATTAAGTTG CGGATTTGGG ATGCGCTTCT GGACCAAACA CACTTTTAAC 240
AGTGCGGGAC ATTGTGCAAA GTATTGACAA AGTTGGCCAG GAAGAGAAGA ATGAATTAGA 300
ACGTCGCCACC ATTCAGATTT TTCTGAATGA TCTTTTCCAA AATGATTTC AATCGGTTTT 360
CAAGTTGCTG CCAAGCTTCT ACCGCAAACG CGAGAAAGAA AATGGACGCA AGATAGGATC 420
GTGCTAATA AGCGCAATGC CTGGCTCTTT CTACGGCAGA CTCTCCCCG AGGAGTCCAT 480
GCATTTTTTG CACTCTGTT ACAGTGTTCA TTGGTTATCT CAGGTTCCCA GCGGTTTGGT 540
GATTGAATTG GGGATTGGTG CAAACAAAGG GAGTATTTAC TCTTCAAAG GATGTCGTCC 600
GCCCGTCCAG AAGGCATATT TGGATCAATT TACGAAAGAT TTTACCACAT TTCTAAGGAT 660
TCATTCGAAA GAGTTGTTTT CACGTGGCCG AATGCTCCTT ACCTGCATTT GTAAAGTAGA 720
TGAATTCGAC GAACCGAATC CCCTAGACTT ACTTGACATG GCAATAAAG ACTTGATTGT 780
TGAGGGACTT CTGGAGGAAG AAAAATTGGA TAGTTTCAAT ATTCCATTCT TTACACCTTC 840
AGCAGAAGAA GTAAAGTGCA TAGTTGAGGA GGAAGGTTCT TGCAGAAATT TATATCTGGA 900
GACTTTTAAG GCCCATTATG ATGCTGCCTT CTCTATTGAT GATGATTACC CAGTAAGATC 960
CCATGAACAA ATTAAGCAG AGTATGTGGC ATCATTAATT AGATCAGTTT ACGAACCCAT 1020
CCTCGCAAGT CATTTTGGAG AAGCTATTAT GCCTGACTTA TTCCACAGGC TTGCGAAGCA 1080
TGCAGCAAAG GTTCTCCACA TGGGCAAAGG CTGCTATAAT AATCTTATCA TTTCTCTCGC 1140
CAAAAAGCCA GAGAAGTCAG ACGTGTAATA GTTTGTTTTT AGTTGGTTTT TGTGCCGTTG 1200
GGGGTCTTTC GGGTATTGTC GTTTTGTATT CGTAATAAAA GTGATGTGCA AGAATAAGAT 1260
ATTAGTACA ATATTTTCAT AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA 1298

```

<210>配列番号: 3

<211>配列の長さ: 385

<212>配列の型: アミノ酸

<213>起源: *Coffea arabica*

<400>配列

```

MELQEVLMHN GGEGEASYAK NSSFNQLVLA KVKPVLEQCV RELLRANLPN INKCIKVADL 60
GCASGPNTLL TVWDTVQSID KVKQEMKNEL ERPTIQVFLT DLFQNDFNSV FMLLPSTYRK 120
LEKENGRIKIG SCLIAAMPGS FHGRLEPEES MHFLHSSYSL QFLSQVPSGL VTELGITANK 180
RSIYSSKASP PPVQKAYLDQ FTKDFTTFLR MRSEELSRG RMLLTICKG DECDGPNTMD 240
LLEMAINDLV AEGRLGEEKL DSFNVPITYA SVEEVKCMVE EEGSFEILYL QTFKLRYDAG 300
FSIDDDCQVR SHSPVYSDEH ARAAHVASLI RSVYEPILAS HFGEAIIIPDI FHREATNAAK 360
VIRLCKGFYN NLIISLAKKP EKSDI 385

```

<210>配列番号: 4

<211>配列の長さ: 1360

<212>配列の型: 核酸

<213>起源: *Coffea arabica*

<400>配列

GTCCTGCATA TGAATGGAGC TCCAAGAAGT CCTGCATATG AATGGAGGCG AAGGCCAAGC 60
 AAGCTACGCC AAGAATTCAT CCTTCAATCA ACTGGTTCTC GCCAAGGTGA AACCTGTCCT 120
 TGAACAATGC GTACGGGAAT TGTGCGGGC CAACTTGCCC AACATCAACA AGTGCATTAA 180
 AGTTGCAGAT TTGGGATGCG CTTCGGGACC AAACACACTT TTAACCGTTT GGGACACTGT 240
 ACAAAGTATT GACAAAAGTTA AGCAAGAAAT GAAGAATGAA TTAGAACGTC CCACCATTCA 300
 GGTTTTCTG ACTGATCTTT TCCAAAATGA TTTCAATTCG GTTTTCATGC TGCTGCCAAG 360
 CTTCTACCGC AAACCTGAGA AAGAAAATGG ACGCAAAATA GGATCGTGCC TAATAGCCGC 420
 AATGCCTGGC TCTTCCACG GCAGACTCTT CCCCAGGAG TCCATGCATT TTTTACACTC 480
 TTCTTACAGT CTTCACTTTT TATCCCAGGT TCCCAGCGGT TTGGTGACTG AATTGGGGAT 540
 CACTGCCAAC AAAAGGAGCA TTTACTCTTC CAAAGCAAGT CCTCCGCCCG TCCAGAAGGC 600
 ATATTTGGAT CAATTACGA AAGATTTTAC CACATTTTAA AGGATGCGTT CGGAAGAGTT 660
 GCTTTCACGT GGCCGAATGC TCCTTACTTG CATTGTAAA GGAGATGAAT GCGACGGCCC 720
 GAATACCATG GACTTACTTG AGATGGCAAT AAACGACTTG GTTGCTGAGG GACGTCTGGG 780
 GGAAGAAAAA TTGGACAGTT TCAATGTTCC AATCTATACA GCTTCAGTAG AAGAAGTAAA 840
 GTGCATGGTT GAGGAGGAAG GTTCTTTTGA AATTTTATAC TTGCAGACTT TTAAGCTCCG 900
 TTATGATGCT GGCTTCTCTA TTGATGATGA TTGCCAAGTA AGATCCCATT CCCCAGTATA 960
 CAGCGATGAA CATGCTAGAG CAGCGCATGT GGCATCATT ATTAGATCAG TTTACGAACC 1020
 CATCCTAGCA AGTCATTTTG GAGAAGCTAT TATACCTGAC ATATTCCACA GGTTTGGCAG 1080
 GAATGCAGCA AAGGTTATCC GCTTGGGCAA AGGCTTCTAT AATAATCTTA TCATTTCTCT 1140
 TGCCAAAAAA CCAGAGAAGT CAGACATATA AAAGCTTGTT TTTAGTTGGT TTTTGTGTTA 1200
 TGGGTTGTTT TCTGATACGG GGAAAGGATT CAGTGCGGTT GGGGTTCTAT CCGAGTATTG 1260
 TACTTTTTAT ATTATTAGTT GGTGTATAAT TATTATGTTA CATTGTATA TTCGTAATAA 1320
 AAGTGACGTA CAAAAATAAA ATATTTTCAT AAAAAAAAAA 1360

<210>配列番号: 5

<211>配列の長さ: 385

<212>配列の型: アミノ酸

<213>起源: *Coffea arabica*

<400>配列

```

MELQEVLMN GGEGDASYAK NSSFNQLVLA KVKPVLEQCV GELLRANLPN INKCIKVADL 60
GCASGPNILL TVRDIVQSID KVRQEMKNEL ERPTIQVFLT DLFQDNFNSV FMLLPSTYRK 120
LEKENGRIKIG SCLIAAMPGS FHGRLEPEES MHFLHSSYSL QFLSQVPSGL VTELGITANK 180
RSIYSSKASP PPVQKAYLDQ FTKDFTTFLR IRSEELSRG RMLLTICKG DEFDPNTMD 240
LLEMAINLV VEGHLEEEKL DSFNVPYAA SVEELKCIVE EEGSFEILYL ETKLRYDAG 300
FSIDDDCQVR SHSPEYSDEH ARAAHVASLL RSVYEPILAN HFGEAIIPDI FHRFATNAAK 360
VIRLGKGFYN NLIISLAKKP EKSDI 385

```

< 2 1 0 > 配列番号 : 6

< 2 1 1 > 配列の長さ : 1 3 0 4

< 2 1 2 > 配列の型 : 核酸

< 2 1 3 > 起源 : *Coffea arabica*

< 4 0 0 > 配列

```

TTTAGCAGTC CCAATTCGAT TTATGTACAA GTCCTGCATA TGAATGGAGC TCCAAGAAGT   60
CCTGCATATG AATGGAGGCG AAGGCGATGC AAGCTACGCC AAGAATTCAT CCTTCAATCA  120
ACTGGTTCTC GCCAAGGTGA AACCTGTCCT TGAACAATGC GTAGGGGAAT TGTTGCGGGC  180
CAACTTGCCC AACATCAACA AGTGCATTAA AGTTGCGGAT TTGGGATGCG CTTCCGGACC  240
AAACACACTT TTAACAGTTC GGGACATTGT ACAAAGTATT GACAAAGTTA GGCAAGAAAT  300
GAAGAATGAA TTAGAACGTC CCACCATTCA GGTTTTCTG ACTGATCTTT TCCAAAATGA  360
TTTCAATTCTG GTTTTCATGT TGCTGCCAAG TTTCTACCGC AAAGTTGAGA AAGAAAATGG  420
ACGCAAGATA GGATCGTGCC TAATAGCCGC AATGCCTGGC TCTTTCCACG GCAGACTCTT  480
CCCCGAGGAG TCAATGCATT TTTTACACTC TTCTTACAGT CTTCAATTTT TATCCCAGGT  540
TCCCAGCGGT TTGGTGAAGT AATTGGGGAT CACTGCGAAC AAAAGGAGCA TTTACTCTTC  600
CAAAGCAAGT CCTCCGCCCC TCCAGAAGGC ATATTGGAT CAATTTACGA AAGATTTTAC  660
CACATTTTAA AGGATTCGTT CGGAAGAGTT GCTTTCACGC GGCCGAATGC TCCTTACTTG  720
CATTTGCAAA GGAGATGAAT TCGACGGCCC GAATACCATG GACTTACTTG AGATGGCAAT  780
AAACGACTTG GTTGTGAGG GACATCTGGA GGAAGAAAAA TTGGACAGTT TCAATGTTCC  840
AATCTATGCA GCTTCAGTAG AAGAATTAAA GTGCATAGTT GAGGAGGAAG GTTCTTTTGA  900
AATTTTGTAC TTGGAGACTT TTAAGCTCCG TTATGATGCT GGCTTCTCTA TTGATGATGA  960
TTGCCAAGTA AGATCCCATT CCCAGAATA CAGCGATGAA CATGCTAGAG CAGCGCATGT 1020
GGCATCATT CTTAGATCAG TTTACGAACC CATCCTCGCA AATCATTTTG GAGAAGCTAT 1080
TATACCTGAC ATATTCCACA GGTTCGAC GAATGCAGCA AAGGTTATCC GCTTGGGCAA 1140
AGGCTTCTAT AATAATCTTA TCATTTCTCT TGCCAAAAAA CCAGAGAAGT CAGACATATA 1200
AAAGCTTGTT TATAGTTGGT TTTGTGCTA TGGTTTGTG TCTGATACGG GGAAAGGATT 1260
TAGTGCGGTT GGGGTTCAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAA

```

1304

<210>配列番号：7

<211>配列の長さ：372

<212>配列の型：アミノ酸

<213>起源：Coffea arabica

<400>配列

```
MELQEVLRMN GGEGDTSYAK NSAYNQLVLA KVKPVLEQCV RELLRANLPN INKCIKVADL 60
GCASGPNTLL TVRDIVQSID KVGQEKKNEL ERPTIQIFLN DLPNDFNSV FKLLPSFYRK 120
LEKENGRKIG SCLIGAMPGS FYSRLFPEES MHFLHSCYCL QWLSQVPSGL VTELGISTNK 180
GSIYSSKASR LPVQKAYLDQ FTKDFTTFLR IHSEELFSHG RMLTICKG VELDARNAID 240
LLEMAINDLV VEGHLEEEKL DSNLPVYIP SAEVVKCIVE EEGSFEILYL ETKVLYDAG 300
FSIDDEHIKA EYVASSVRV YEPILASHFG EAIIPDIFHR FAKHAAKVLP LGKGFYNNLI 360
ISLAKKPEKS DV 372
```


<210>配列番号: 8

<211>配列の長さ: 1316

<212>配列の型: 核酸

<213>起源: *Coffea arabica*

<400>配列

```

CTTTGGCAGT CCCAATTTGA TTTATGTACA AGTCCTGCAT ATGAATGGAG CTCCAAGAAG 60
TCCTGCGGAT GAATGGAGGC GAAGGCGATA CAAGCTACGC CAAGAATTCA GCCTACAATC 120
AACTGGTTCT CGCCAAGGTG AAACCTGTCC TTGAACAATG CGTACGGGAA TTGTTGCGGG 180
CCAACTTGCC CAACATCAAC AAGTGCATTA AAGTTGCGGA TTTGGGATGC GCTTCTGGAC 240
CAAACACACT TTTAACAGTT CGGGACATTG TCCAAAGTAT TGACAAAGTT GGCCAGGAAA 300
AGAAGAATGA ATTAGAACGT CCCACCATTG AGATTTTCTT GAATGATCTT TTCCCAAATG 360
ATTTCAATTC GGTTTTCAAG TTGCTGCCAA GCTTCTACCG CAAACTTGAG AAAGAAAATG 420
GACGCAAAAT AGGATCGTGC CTAATAGGGG CAATGCCCGG CTCTTTCTAC AGCAGACTCT 480
TCCCCGAGGA GTCCATGCAT TTTTACACT CTGTACTG TCTTCAATGG TTATCTCAGG 540
TTCCTAGCGG TTTGGTGACT GAATTGGGGA TCAGTACGAA CAAAGGGAGC ATTTACTCTT 600
CCAAAGCAAG TCGTCTGCCC GTCCAGAAGG CATATTTGGA TCAATTTACG AAAGATTTTA 660
CCACATTTCT AAGGATTCAT TCGGAAGAGT TGTTTTCACA TGGCCGAATG CTCCTTACTT 720
GCATTTGTAA AGGAGTTGAA TTAGACGCCC GGAATGCCAT AGACTTACTT GAGATGGCAA 780
TAAACGACTT GGTGTGTGAG GGACATCTGG AGGAAGAAAA ATTGGATAGT TTCAATCTTC 840
CAGTCTATAT ACCTCAGCA GAAGAAGTAA AGTGCATAGT TGAGGAGGAA GGTTCCTTTG 900
AAATTTTATA CCTGGGAGCT TTTAAGGTCC TTTACGATGC TGGCTTCTCT ATTGACGATG 960
AACATATTAA AGCAGAGTAT GTTGCATCTT CCGTTAGAGC AGTTTACGAA CCCATCCTCG 1020
CAAGTCATTT TGGAGAAGCT ATTATACCTG ACATATTCCA CAGGTTTGGC AAGCATGCAG 1080
CAAAGGTTCT CCCCTTGGGC AAAGGCTTCT ATAATAATCT TATCATTCTT CTCGCCAAAA 1140
AGCCAGAGAA GTCAGACGTG TAAAAGTTTG TTTTGTGTT GGGGAAAGGA ATAAGTGCCG 1200
TTGGGGGTCT TTCGGGTATT GTGCTTTTGA TATTATATTG TTTTGTATCC GTAATAAAAG 1260
TGGTGTGTAA GAATAAGATA TTTGACATAT ATTATTTTCA AAAAAAAAAA AAAAAA 1316

```

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、カフェイン生合成の経路を示す図である。

【図2】

図2は、MTL1、MTL2、MTL3及びMXMT1 より得たcDNAの塩基配列を示す図である。

【図3】

図3は、MXMT1、MTL2及びMTL3より得たアミノ酸配列のアラインメントを示す図である。

【図4】

図4は、MTL2、MTL3及びMXMT1 より得た融合蛋白質をSDS-PAGEで解析した結果を示す写真である。

【図5】

図5は、MTL2、MTL3及びMXMT1 より得た融合蛋白質の酵素活性を、TLC で解析した結果を示す写真である。

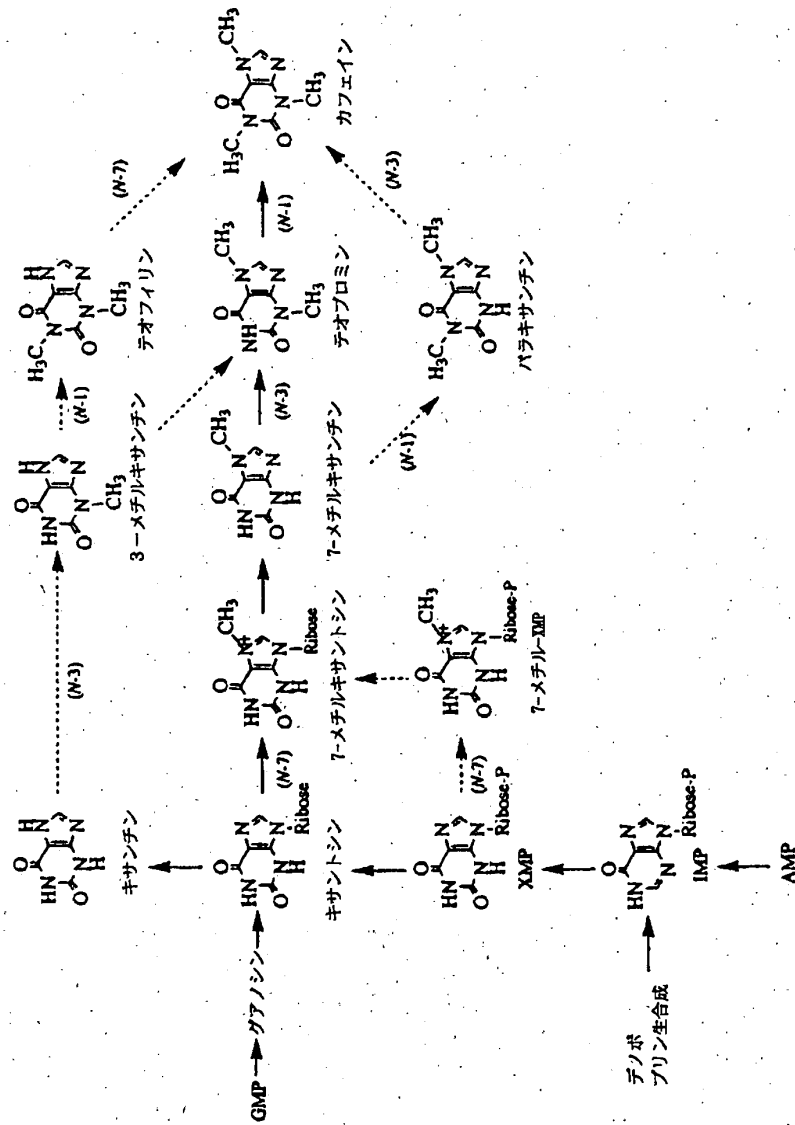
【図6】

図6は、MXMT1 より得た融合蛋白質の酵素反応生成物をHPLCで同定した結果を示すチャートである。

【書類名】

図面

【図 1】



【図2】

A

GTCTGCATA TGAATGGAGC TCCAAGAAGT CCTGCATATG AATGGAGGCG AAGGCGAAGC AAGCTACGCC AAGAATTCAT CCTTCAATCA	90
ACTGGTTCTC GCGAAGGTGA AACCTGTCTT TGAACAATGC GTACGGGAAT TGTTCGGGCG CAACCTGCCC AACATCAACA AGTGCAATTA	180
AGTTGCAGAT TTGGGATGCG CTTCGGGACC AAACACACTT TTAACGGTTT GGGACACTGT ACAGAGTATT GACAAGATTA AGCAAGAAT	270
GAAGAATGAA TTAGAACGTC CCACCAATTA GGTTTTCTG ACTGATCTTT TCCAAGATGA TTCAATTCG GTTTTCATGC TGCTGCCAAG	360
CTTCTACCGG AAATCTGAGA AAGAAAATGG ACCGAAAATA GGATCGTGCC TAATAGCCCG AATGCGTGGC TCTTCCACG CGACGACTCT	450
CCCCGAGGAG TCGATGGATT TTTTACACTC TTCTTACAGT CTTCAGTTTT TATCCGAGGT TCCGAGCGGT TTGGTGACTG AATTGGGGAT	540
CACCTGGGAC AAAAGGAGCA TTTACTCTTC CAAGCAAGT CCTCCGCCCG TCCAGAAGCG ATATTGGGAT CAATTACGA AAGATTTTAC	630
CACATTTTTA AGGATGCGTT CGGAAGAGTT GCTTTCAGT GCGCGAATGC TCTTACTTG CATTTGTAAA GGAGATGAAT GCGACGGGCC	720
GAATACCATG CACTTACTTG AGATGGCAAT AAACGACTTG GTTCTGAGG GAGTCTGGG GGAAGAAAAA TTGCAGACTT TCAATGTTCC	810
AATCTATACA GCTTCAGTAG AAGAAGTAAA GTGCATGGTT GAGGAGGAAG GTTCTTTTGA AATTTTATAC TTGCAGACTT TTAAGCTCCG	900
TTATGATGCT GGCTTCTCTA TTGATGATGA TTGCAAGTA AGATCCCAAT CCCAGTATA CAGCGATGAA CATGCTAGAG CAGCGCATGT	990
GGCATCATTG ATTAGATGAC TTTACGAACC CATCTAGCA AGTCATTTTG GAGAAGCTAT TATACCTGAC ATATTCACCA GGTTCGAC	1080
GAATGACGCA AAGGTTATCC GCTTGGGCAA AGGCTTCTAT AATAATCTTA TCAITTTCTCT TGCCAAAAA CAGAGGAAGT CAGACATATA	1170
AAAGCTTGT TTTAGTTGTT TTTTGTGTTA TGGGTTGTT TCTGATACGG GGAAGGATT CAGTGGGTT GGGGTTCTAT CCGAGTATTG	1260
TACTTTTAT ATTATTAGTT GGTGTATAAT TATTATGTTA CATTGTTATA TTGTAATAA AAGTGACGTA CAAAAATAA ATATTTTCAT	1350
AAAAAAAA	1360

B

TTTAGCAGTC CCAATTGAT TTATGTACAA GTCTGCATA TGAATGGAGC TCCAAGAAGT CCTGCATATG AATGGAGGCG AAGGCGATGC	90
AAGCTACGCC AAGAATTCAT CCTTCAATCA ACTGTTCTC GCGAAGGTGA AACCTGTCTT TGAACAATGC GTAGGGGAAT TGTTCGGGCG	180
CAACTGCCCC AACATCAACA AGTCATTAAT AGTTGGGAT TTGGGATGCG CTTCGGGACC AAACACACTT TTAACGACTT GGGACATTTG	270
ACAAAGTATT GACAAAGTAT GCGAAGAAAT GAAGAATGAA TTAGAAGCTC CCACCAATTA GGTTTTCTG ACTGATCTTT TCCAAGATGA	360
TTTCAATTCG GTTTTCATGT TGCTGCAAG TTCTACCGG AAATCTGAGA AAGAAAATGG ACCGAAAGTA GGATCGTGCC TAATAGCCCG	450
AATGCGTGGC TCTTCCACG CGAGACTCTT CCGCGAGGAG TCAATGCAAT TTTTACACTC TTCTTACAGT CTTCATTTT TATCCGAGGT	540
TCCGAGCGGT TTGGTGACTG AATTGGGGAT CACTGGAAC AAAAGGAGCA TTTACTCTTC CAAGCAAGT CCTCCGCCCG TCCAGAAGGC	630
ATATTGATG CAATTTCAGA AAGATTTTAC CACATTTTTA AGGATTCGTT CGGAAGAGTT GCTTTCAGCG GCGCGAATGC TCTTACTTG	720
CATTTGCAAA GGAGATGAAT TCGAGGCCCG GAATACCATG GACTTACTTG AGATGGCAAT AAACGACTTG GTTGTGAGG GACATCTGGA	810
GGAGAAAAA TTGGCAGTT TCAATGTTCC AATCTATGCA GCTTCAGTAG AAGAATTAAT GTGCATAGTT GAGGAGGAAG GTTCTTTTGA	900
AATTTTGTAC TTGGGACTT TTAAGTCCCG TTATGATGCT GGCTTCTCTA TTGATGATGA TTGCAAGTA AGATCCCAAT CCCGAGAATA	990
CAGCGATGAA CATGCTAGAG CAGCGCATTT GGCATCTTAA CTYAGATCAG TTAACGAACC CATCTCGCCA AATCATTTTG GAGAAGCTAT	1080
TATACCTGAC ATATTCCACA GGTTCGACG GAATGACGCA AAGGTTATCC GCTTGGGCAA AGGCTTCTAT AATAATCTTA TCAITTTCTCT	1170
TGCCAAAAA CCAGAGAAGT CAGACATATA AAAGCTGTT TATAGTTGTT TTTTGTGTTA TGGTGTGTT TCTGATACGG GGAAGGATT	1260
TAGTGGGTT GGGGTTCAAA AAAAAAATA AAAAAAATA AAAA	1304

C

CTTGGCACT CCCAATTGA TTATGTACAA AGTCTGCAT ATGAATGGAG CTCCAAGAAG TCTTCGGAT GAATGGAGCG AAGGCGATA	90
CAAGCTACGC CAGAATTTCA GCTTCAATCA ACTGTTCTC GCGAAGGTGA AACCTGTCTT TGAACAATGC GTAGGGGAAT TGTTCGGGCG	180
CAACTGCCCC CAACATCAAC AAGTGCATTA AAGTTGGGAT TTGGGATGCG GCTTCCGAC CAACACACTT TTAACGACTT GGGACATTTG	270
TCCAAGTATT TGCAAGATTT GCGCAAGTAA AGAAGAATGA ATTAGAAGCT CCACCAATTA AGATTTTCTT GAATGATCTT TCCCAAGT	360
ATTCAATGTC GGTTTTCATG TTGCTGCAAG TTCTACCGG CAACCTGAG AAGAAAATGG GAGCGAAAT AGGATCGTG CTAATAGGGG	450
CAATGCCCCG CTCTTCTAC AGCAGACTCT TCCCGAGGA GTCCATGCAAT TTTTACACT CTGTGACTG TCTTCAATGC TTATCTCAGG	540
TTCTACGCG GTTGTCAAG TTGCTGCAAG TCAATGCAAT TTTTACACT CCAAGGAGAG ATTACTCTT CCAAGGCAAG TGTGTGCGG GTCCAGAAGG	630
CATATTGGA TCAATTTACG AAGATTTTAA CCAATTTCT AAGGATTCAT TCGGAAGAT TGTTTTCACA TGCGCGAATG CTCTTACTT	720
GCAATTTGTA AAGATTTGAA TTAAGCGCCC TGAAGCGCCC GGAATGCCAT AGACTTACTT GAGATGGCAA TAAACGACTT GGTGTGAGG GGCATCTGG	810
AGGAAGAAA ATTGATAGT TTAAGCTTC CAGTCTATAT ACCTTCAGCA GAAGAAGTA AGTGCATAGT TGAGGAGGA GGTCTTTTG	900
AAATTTTATA CCGGAGACT TTAAGGTC TTTACGATG TGCTTCTCT ATTGACGATG AACATATTA AGCAGATAT GTTGATCTT	990
CCGTAGAGG AGTTACGAA CCAATCTCTG CAAGTCAATT TGGAAGAGCT ATTACTCTG ACATATTCCA CAGGTTTGGG AAGCATGCG	1080
CAAGGTTCT CCGCTTGGG AAGGCTCTT AATAATCTT TATCATTTCT CTGCGAAAA AGCCAGAGAA GTCCAGCTG TAAAGTTTG	1170
TTTTGTGTT GGGGAAGGA ATAAGTGGG TTGGGGTCT TTGGGATTT GTGCTTTTAA TATTATATTG TTTTGTATCC GTAATAAAG	1260
TGGTGTGTA GAATAAGTA TTGACATAT ATTATTITCA AAAAAAATA AAAAAA	1316

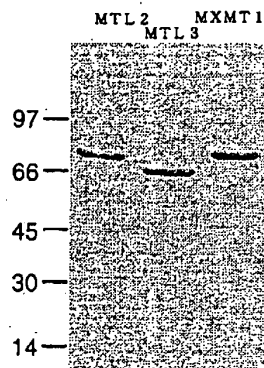
D

AGCAGTCCGA ATTGATGTT CCTGCATATG AATGGAGCTC CAAGAAGTCC TGCAATGAA TGAAGGTGAA GCGGATACAA GCTACGCCAA	90
GAATGATCC TACAATCTGG CTCTTGCAAA GGTGAACCT TTCTTGAAC AATGCATAGC AGAATGTTG CGGGCCAAT TGCCCAACAT	180
CAACAGTGC ATTAAGTGTG CGATTTGGG ATGCGCTCTT GGACCAAGCA CACTTTAAC AGTGGGGGAC ATTGTGCAA GTATTGACAA	270
AGTTGGGCG GAAGGAGGA ATGAATTAGA AGTCCGACC ATTCAAGATT TTCTGAATGA TCTTTTCCA AATGATTTCA ATTCGTTTT	360
CAAGTGTCT CCAAGCTTCT ACCGCAAACT CGAGAAGAA AATGGAGCGA AGATAGGATC GTGCTAATA AGCGCAATGC CTGGCTCTTT	450
CTACGGGAGA CTCTCCCGG AGAGTCCAT GCAATTTTTG CACTCTGTT ACAGTGTTC TGGTATCTT CAGGTTCCCA CGCGTTTGGT	540
GATTGAATG GGGATGTTG CAAGCAAGG GAGTATTAC TCTTCCAAAG GATGCTGTC CCGGCTCCAG AAGGCAATT TGGATCAAT	630
TACGAAGAT TTAACCAT TTTAAGGAT TCAITCGAAA GAGTGTGTT CAGCTGGCGG AATGCTCTT ACCTGCATT GTAAAGTAGA	720
TGAATTCGAC GAACGATC CCTAGACTT ACTTGATG GCAATAAGCG ACTTGATTG TGAGGAGACT CTGAGGAAG AAAAATTGGA	810
TAGTTTCAAT ATTCAATCT TTACACTTTC AGCAGAGAA GTAAAGTGA TAGTTCAGGA GGAAGTTCT TCGCAATTT TATATCTGGA	900
GACTTTAAG GCGCATATG ATGCTGCTT CTCTATTGAT GATGATTACC CAGTAAGATC CCAAGAACAA ATTAAGGAG AGTATGTCG	990
ATCATTAAT AGATCAGTT ACAGAACCAT CTTCGCAAGT CATTTTGGAG AAGTATTATT GCTTGAATTA TTCCACAGCG TTGCGAAGCA	1080
TGACGACAAAG GTTCTCCACA TGCGCAAGG TCTCTATAAT AATCTTATCA TTCTCTCGC CAAAAAGCCA GAGAAGTCA AGGTGTAAAA	1170
GTGTTGTTT AGTGGTTTT TGTCGGTTG GGGGCTTTC GGGTATTGTC GTTTGTATT CGTAATAAAA GTGATGTGA AGAATAAGAT	1260
ATTATGACAA ATATTTTCAT AAAAAAATA AAAAAAATA	1298

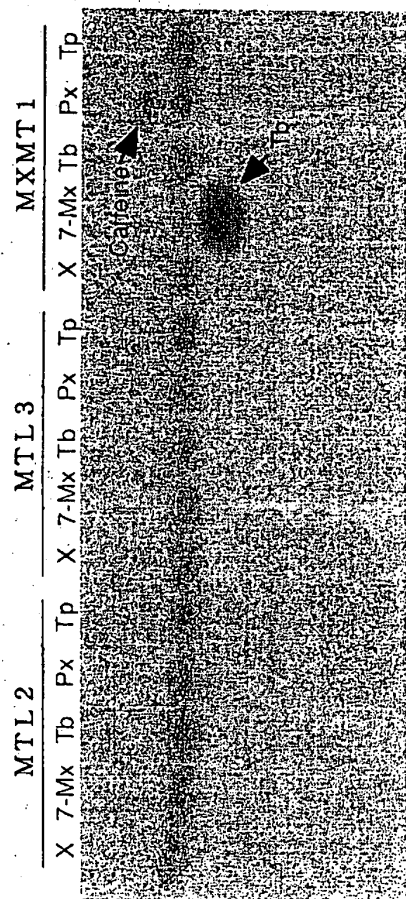
【図3】

MXMT1	MEIQEVLHNEGEGDTSYAKNASN-LALAKVKFFLEQCIREFANLEN	49
MTL1G::EA::...S:F:Q:V::...V::V::.....	50
MTL2G::A::...S:F:Q:V::...V::VG::.....	50
MTL3R::G::.....SA::Q:V::...V::V::.....	50
MXMT1	INCKIKVALGCCAGENTLLTVADTVQSTIKVGQEEKNELERPTIQIFLN	99
MTL1:W:T::...K::M::...V::T	100
MTL2:R::M::...V::T	100
MTL3:K::.....	100
MXMT1	DLFQDNFNSVFKLLPSFYRKLEKNGRKIGSCLISAMPGSFYGRFPPEES	149
MTL1:M::.....A::...H::...	150
MTL2:M::.....A::...H::...	150
MTL3	...P::.....S::...	150
MXMT1	MHFLHSCYSVHALSQVPSGLVTELGIGANKGSTYSSKGRPPVQKAYLDQ	199
MTL1S::LQF::.....T::T::R::...ASP::.....	200
MTL2S::LQF::.....T::T::R::...ASP::.....	200
MTL3CLQ::.....T::ST::...AS:L::.....	200
MXMT1	FKQDFTPLRIHSKELFSRGMLLTCICKVDEDEPNFLDLLDMAINLI	249
MTL1:MR:E::L::.....G::C:G::TM::E::...V	250
MTL2:R:E::L::.....G::G::TM::E::...V	250
MTL3:E::H::...GE:L:AR:AI::E::...V	250
MXMT1	VEGLLEEKLDNFNIPFFTPSAEEVKCIVEEGSCETLYLETFGHYDAA	299
MTL1	A::R:G::...V:IY:A:V::...M::...F::...Q::LR::G	300
MTL2	...H::...V:IYAA:V::L::...F::...LR::G	300
MTL3	...H::...L:VVI::...F::...VL::G	300
MXMT1	FSIDDDYPRSH-----EQIKAEVASLIRSVVEPIASHFGADMDL	343
MTL1CQ::...SPVYSD:HAR:AH::.....L::I	350
MTL2CQ::...SPEYSD:HAR:AH::...L::...N::...I::I	350
MTL3EH-----SV:A::...I::I	337
MXMT1	FHRLAKHAAKVLHMKGCYNNLIISLAKPEKSDV	378
MTL1	...F:TN::...IRL::F::...I	385
MTL2	...F:TN::...IRL::F::...I	385
MTL3	...F::...FL::F::...	372

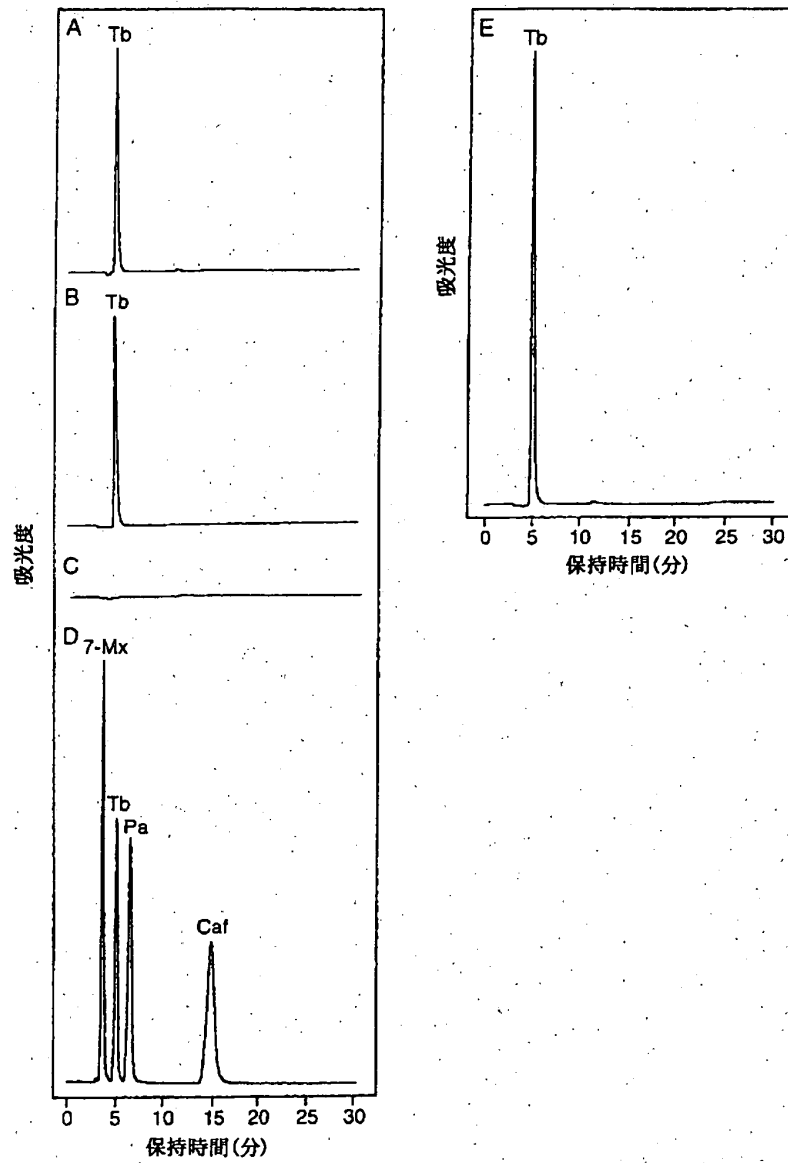
【図4】



【図5】



【図6】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 カフェインレスコーヒーを得る為に、カフェインの生合成に関与する酵素を得る。

【解決手段】 本発明により、コーヒーアラビカにおけるテオブロミン合成酵素のポリペプチド及び当該ポリペプチドをコードする遺伝子が与えられた。テオブロミン合成酵素はカフェインの生合成に関与する酵素であり、当該酵素の遺伝子発現を抑制した形質転換植物を作製することにより、カフェインレスコーヒーを得ることができる。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願2000-307149
受付番号	50001297271
書類名	特許願
担当官	第二担当上席 0091
作成日	平成12年10月10日

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】

598169457

【住所又は居所】

奈良県生駒市高山町8916-5

【氏名又は名称】

奈良先端科学技術大学院大学長

【代理人】

申請人

【識別番号】

100072051

【住所又は居所】

東京都千代田区霞が関3-2-4 霞山ビル7階

【氏名又は名称】

杉村 興作

【選任した代理人】

【識別番号】

100059258

【住所又は居所】

東京都千代田区霞が関3-2-4 霞山ビル7階

【氏名又は名称】

杉村 暁秀

出願人履歴情報

識別番号

[598169457]

1. 変更年月日 1998年12月 9日

[変更理由] 新規登録

住 所 奈良県生駒市高山町8916-5

氏 名 奈良先端科学技術大学院大学長



SWORN TRANSLATION

I, Noriko TSUJIMOTO, hereby declare and state that I am knowledgeable of each of the Japanese and English languages and that I made the attached translation of the attached application from the Japanese language into the English language and that I believe my attached translation to be accurate, true and correct to the best of my knowledge and ability.

I hereby declare that all statements made herein of my own knowledge are true and that all statements made on information and belief are believed to be true and further that these statements were made with the knowledge that willful false statements and the like so made are punishable by fine or imprisonment, or both, under Section 1001 of Title 18 of the United States Code, and that such willful false statements may jeopardize the validity of the application or any patent issued therefrom.

Date : January 10, 2003

Declarant : Noriko Tsujimoto
Noriko TSUJIMOTO



[Identification of Document]	Petition for Patent Application
[Reference Number]	2000P095
[Date of Submission]	October 6, 2000
[Addressee]	Commissioner, Patent Office: Kozo OIKAWA
[International Patent Classification]	A01H 3/00 C12N 15/00
[Title of the Invention]	THEOBROMINE SYNTHASE POLYPEPTIDE OF COFFEE PLANT AND THE GENE ENCODING SAID POLYPEPTIDE
[Number of Claims]	8
[Inventor]	
[Address]	2-7-15, Shikanodai-nishi, Ikoma City, Nara Pref., Japan
[Name]	Hiroshi SANO
[Inventor]	
[Address]	2-7-12-203, Tomiomoto-machi, Nara City, Nara Pref., Japan
[Name]	Tomonobu KUSANO
[Inventor]	
[Address]	C505, 8916-5, Takayama-Cho, Ikoma City, Nara Pref., Japan
[Name]	Nozomu KOIZUMI
[Applicant]	
[Identification Number]	391016923
[Name]	President of NARA INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY Yasuyuki YAMADA
[Representative]	
[Identification Number]	100072051
[Patent Attorney]	
[Name]	Kosaku SUGIMURA
[Representative]	
[Identification Number]	100059258
[Patent Attorney]	
[Name]	Akihide SUGIMURA

[List of Attached Items]

[Identification of Item]

Specification: 1

[Identification of Item]

Drawing : 1

[Identification of Item]

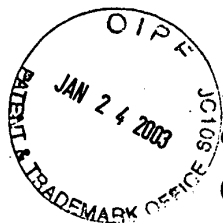
Abstract : 1

[General Authorization
Number]

9900570

[Identification of Document] Specification

[Title of the Invention] THEOBROMINE SYNTHASE POLYPEPTIDE OF COFFEE PLANT AND THE GENE ENCODING SAID POLYPEPTIDE



[Claims]

[Claim 1] A polypeptide consisting of an amino acid sequence of following (a)

or (b):

(a) an amino acid sequence defined by amino acid numbers from 1 to 378 shown in SEQ ID NO: 1 in a Sequence List,

(b) an amino acid sequence in which a part of said amino acid sequence (a) is deleted, substituted or added with another amino acid sequence, the amino acid sequence (b) having the activity to biosynthesize theobromine using 7-methylxanthine as the substrate.

[Claim 2] A gene encoding the polypeptide according to Claims 1.

[Claim 3] A gene consisting of a base sequence of following (c) or (d):

(c) a base sequence defined by base numbers from 1 to 1298 shown in SEQ ID NO: 2 in a Sequence List,

(d) a base sequence in which a part of base sequence (c) is deleted, substituted or added with another base sequence, the base sequence (d) encoding a polypeptide having the activity to biosynthesize theobromine using 7-methylxanthine as the substrate.

[Claim 4] A transformed plant wherein expression of the gene according to Claim 2 or 3 is decreased in the plant to inhibit biosynthesis of theobromine.

[Claim 5] A seed obtained from the transformed plant according to Claim 4.

[Claim 6] A transformed plant wherein gene according to Claim 2 or 3 is introduced to increase biosynthesis of theobromine.

[Claim 7] A seed obtained from the transformed plant according to Claim 6.

[Claim 8] A method for production of a transformed plant in which biosynthesis of theobromine is decreased by inhibiting expression of the gene according to Claim 2 or 3.

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Field of the Invention]

This invention relates to theobromine synthase polypeptide and the gene

encoding said enzyme.

[0002]

[Prior Art]

Coffee is a drink consumed all over the world with favorite and its utility is markedly large. On the other hand, it is known that excessive ingestion of caffeine, which is contained in coffee, causes harmful effects. Caffeine is one of xanthine derivatives and theophylline and theobromine are also the members of the xanthine derivatives. These xanthine derivatives are known to inhibit phosphodiesterase, thereby the amount of cAMP is increased. As the result, xanthine derivatives exhibit excitatory effect on the central nerves system and enhance function of the circulatory system. When they are ingested at a suitable amount, such effects of xanthine derivatives are useful for spiritual elevation. However, when the amount of digestion is excessive, they would cause harmful effects as mentioned above. Therefore, there has been a strong demand on production of a caffeine-less coffee all over the world.

[0003]

[Problems to be Solved by the Invention]

To obtain caffeine-less coffee, attempts to obtain a gene involved in biosynthesis of xanthine derivatives have been performed, in the purpose to achieve artificial control of biosynthesis of caffeine. In Fig. 1 (cited from Advances in Botanical Research, Vol. 30, Academic Press (1999) p149), the pathway working for caffeine biosynthesis in coffee plants is shown. In Fig. 1, the arrow with solid line indicates the main pathway of caffeine synthesis and the arrow with dotted line indicates the minor pathway of caffeine synthesis, respectively. As shown in the second line of Fig. 1, the pathway operating for biosynthesis of caffeine from xanthosine via 7-methylxanthine and theobromine has been known, which is the main pathway for biosynthesis of caffeine biosynthesis in coffee plants. The latter half of the main biosynthesis pathway of caffeine is composed of three steps of N-methylation reactions. These N-methylation reactions have been known to be dependent on S-adenosylmethoinine. There also exists a pathway (third line in Fig. 1) in which caffeine is biosynthesized from 7-methylxanthine via para-xanthine, but it is known that contribution of this pathway is not significant. With regard to the first methylation reaction to synthesize 7-methylxanthine, a gene encoding an enzyme responsible for said reaction has been obtained and it has been already

reported (International Laid-Open Publication No. WO 97/35960). However, genes involved in the second step methylation reaction and the third step methylation reaction have not been known yet. For effective and accurate manipulation of caffeine biosynthesis, more knowledge on genes that encode enzymes involved in caffeine biosynthesis should be obtained.

[0004]

[Solution for Problems]

The present inventors remarked an enzyme participating to the second methylation step reaction and responsible for biosynthesis of theobromine, and they have obtained the gene encoding the enzyme. The enzyme is an enzyme operating to catalyze biosynthesis of theobromine from 7-methylxanthine. Therefore, when expression of the gene encoding said enzyme is inhibited, it would result in decrease of theobromine biosynthesis. In the pathway of caffeine biosynthesis, caffeine is synthesized through N-methylation of theobromine. Then when biosynthesis of theobromine is inhibited, biosynthesis of caffeine would be inhibited as well. As described above, theobromine and caffeine exhibit similar pharmacological effect as xanthine derivatives. Therefore, isolation of a gene encoding an enzyme, which enables concurrent manipulation of theobromine biosynthesis and caffeine biosyntheses, has a great significance. That is, if a gene encoding an enzyme responsible for the final step of caffeine biosynthesis, i.e. the third methylation step is obtained and expression of the gene is inhibited, biosynthesis of caffeine would be reduced, but biosynthesis of theobromine would not be reduced. As a result, accumulation of theobromine is expected to occur, as the metabolism of theobromine is inhibited. Thus, considering that pharmacological effect of theobromine is similar to that of caffeine, the effect of the present invention, which relates to isolation of a gene encoding theobromine synthase, can be estimated to be significant.

[0005]

[Mode for carrying out the Invention]

The present invention relates to theobromine synthase gene derived from *Coffea arabica*, consisting of a base sequence defined by the base numbers 1 to 1298 shown in SEQ.ID. NO:2 in a Sequence List. As described above, in coffee plants, theobromine synthase catalyzes methylation reaction at biosynthesis of theobromine using 7-methylxanthine as the substrate. The gene defined by the base sequence

described in SEQ.ID. NO:2 in a Sequence List is a gene encoding such theobromine synthase having.

[0006]

According to technique of gene recombination, artificial modification can be achieved at a specific site of basic DNA, without alteration or with improvement of basic characteristic of said DNA. Concerning a gene having native sequence provided according to this invention or modified sequence different from said native sequence, it is also possible to perform artificial modification such as insertion, deletion or substitution to obtain gene of equivalent or improved characteristic compared with said native gene. Moreover, a gene with such mutation is also included in the range of this invention. That is, the gene, consisting of a base sequence in which a part of base sequence shown in SEQ ID NO: 2 is deleted, substituted or added with another base sequence, means a gene in which 10 or less, preferably 7 or less, and more preferably 3 or less bases of the sequence is deleted, substituted or added to the base sequence shown in SEQ ID NO: 2 in a Sequence List. Moreover, such gene exhibits homology 90% or more, preferably 95% or more and still preferably 99% or more with the base sequence shown in SEQ ID NO: 2 in a Sequence List. In addition, such gene hybridizes with the base sequence shown in the SEQ ID NO: 2 in a Sequence List under stringent condition. Such gene is also within the range of this invention so far as it encodes a polypeptide having the characteristic as theobromine synthase, that catalyzes biosynthesis of theobromine using 7-methylxanthine as the substrate.

[0007]

Furthermore, this invention relates to polypeptide of theobromine synthase derived *Coffea arabica*, consisting of an amino acid sequence defined by the amino acid numbers from 1 to 378 shown in SEQ ID NO: 1 in a Sequence List. The polypeptide consisting of an amino acid sequence in which a part of said polypeptide defined by amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 1 is deleted, substituted or added with another amino acid sequence means a polypeptide in which 10 or less, preferably 7 or less, and more preferably 3 or less amino acids of the sequence is deleted, substituted or added to the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 1 in a Sequence List. Moreover, such polypeptide exhibits homology 90% or more, preferably 95% or more and still preferably 99% or more with the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 1 in a Sequence List. Such polypeptide is also

within the range of this invention so far as it exhibits characteristic as theobromine synthase, that catalyzes biosynthesis of theobromine using 7-methylxanthine as the substrate. Incidentally, the polypeptides shown in SEQ.ID. NO:3, SEQ.ID. NO:5 and SEQ.ID. NO:7 in a Sequence List can be obtained from *Coffea arabica*, and the polypeptides have higher than 80% of homology compared with the amino acid sequence of SEQ.ID. NO:1 in a Sequence List. These three polypeptides did not exhibit activity as theobromine synthase, despite of high homology to SEQ.ID. NO:1 in a Sequence List.

[0008]

A transformed plant, in which expression of theobromine synthetase gene described in SEQ.ID. NO:2 in a Sequence List is inhibited to decrease biosynthesis of theobromine, is also within the scope of the present invention. The theobromine synthase gene of the present invention is, as mentioned above, a gene encoding an enzyme involved in biosynthesis of theobromine in *coffea arabica*. Thus, by inhibiting expression of the gene according to the present invention, biosynthesis of theobromine is assumed to decrease in a plant, whereby it enables decrease of theobromine content and caffeine content in the plant. As a plant of the target in which expression of theobromine synthase gene of the present invention is inhibited, coffee plants such as *Coffea arabica*, *Coffea canephora*, *Coffea liberica* and *Coffea dewevrei* and the like can be exemplified.

[0009]

In these plants, by inhibiting expression of the gene of the present invention, biosyntheses of theobromine and caffeine would be reduced. As a means for inhibiting expression of the gene, a method utilizing an antisense gene of the gene according to present invention can be adopted. The antisense gene means a gene that expresses a base sequence complementary to mRNA, a transcription product of DNA constituting a certain gene. The transcription product of the antisense gene is complementary to an inherent mRNA, then the antisense gene can inhibit gene expression at the stage of translation. By utilizing this technique, expression of theobromine synthase gene can be inhibited.

[0010]

In addition, other methods that can inhibit expression of a gene have been known. By destruction of a targeted gene, expression of the gene can be inhibited.

Moreover, in a plant, technique of co-suppression (transwitch technique) has been known. According to the technique, expression of the targeted gene can be inhibited by phenomenon of gene interference, even when sense gene is introduced and over-expressed. Moreover, it has been reported in recent years that Double-stranded RNA interference (RNAi) method using a double stranded RNA is effective to inhibit expression of a gene (Chiou-Fen Chuang et al. PNAS (2000) vol. 97, 4985-4990). It has been demonstrated that a double strand RNA can inhibit expression of a gene in a sequence specific manner, according to the research mainly utilizing nematodes (*C.elegans*) or fruit fly. In the RNAi method, such double strand RNA is utilized and it has been recently demonstrated that the method is effective for not only nematodes or fruit fly but also for plants such as *Arabidopsis thaliana* Heynh. The mechanism involved in inhibition of gene expression by the RNAi method is not known yet. However, this method would enable inhibition of expression of a gene, with higher efficiency compared with the above-mentioned antisense method.

[0011]

By the way, purine alkaloids such as caffeine and theobromine, can exhibit effect to avoid insects and the effect is considered to be the existence value of purine alkaloids in a plant. Thus, the gene of the present invention can be introduced in a plant and biosynthesis of theobromine can be increased in the plant, whereby the plant body would exhibit insect-avoiding activity. As described above, the enzyme of the present invention is responsible for biosynthesis of theobromine using 7-methylxanthine as the substrate. Therefore, it is assumed that, when the above-mentioned gene encoding the 7-methylxanthine synthase (International Laid-Open Publication WO 97/35960) and the gene of the present invention are introduced into a plant concurrently, the effect would be particularly significant. When the activity of 7-methylxanthine synthase is enhanced, the amount of substrate available for the enzyme according to the present invention would be increased. As a result, accumulation of theobromine, which is the objective product, is expected to occur.

[0012]

As a method to produce a transformant, a method generally well known in this art can be adopted. A vector available for the present invention may include plasmid vectors, for example pBI121 can be exemplified, but the scope the vector is not to be limited to them. Such vector can be introduced into, for example,

Agrobacterium. Then the bacteria can be utilized for infection of callus or plantlets, resulting in production of transformed plants. Furthermore, it is possible to obtain seeds derived from such transformed plants. In Japanese Laid-Open Patent Application No. 2000-245485, the present inventors have reported a method comprising infection of an embryogenic callus of a coffee plant by *Agrobacterium tumefaciens* EHA101 and the method enables transformation of coffee plants with high efficacy. The method for transformation described in Japanese Laid-Open Patent Application No. 2000-245485 is assumed to be particularly useful.

[0013]

[EXAMPLES]

(Amplification by PCR)

A pair of degenerate oligonucleotide (Forward primer, GGITGYDSIDSIGGICCAAYAC; Reverse primer, ARIYKIYYRTRRAAISWICCIGG) was synthesized, based on the region conserved among TCS1 (Kato et al., 2000, GenBank accession no. AB031280) and two proteins (Z99708 and AC008153), with their functions unknown, of *Arabidopsis thaliana*. These oligonucleotides correspond to amino acid sequences of GC(A/S)(A/S)GPNT and PGSF(H/Y)(G/K)(R/N)LF, respectively. In a 25 μ l of reaction mixture containing *Coffea arabica* cDNA and the above-mentioned primer pair, PCR was performed under the conditions described below. That is, after reaction at 94°C for one minute, 30 cycles of denaturation at 94°C for 30 seconds, annealing at 52°C for 30 seconds and extension at 72°C for one minutes was performed, which was followed by a final extension at 72°C for 7 minutes, whereby the PCR reaction was completed. The amplified cDNA fragment of about 270 base pairs was used for screening of cDNA library.

[0014]

(cDNA library construction and screening of the target cDNA)

Total RNA was extracted from young leaves of coffee (*Coffea arabica*) and it was purified to mRNA by oligo-dT column (Pharmacia). cDNA was synthesized from mRNA using ZAPII cDNA synthesis kit (Stratagene), it was introduced into λ ZAPII vector to prepare phage library. Then cDNA library was screened using the above-mentioned amplified fragment as a probe. Thirty-five of resulting positive plaques were selected randomly and converted to plasmids, then

physical mapping and partial sequencing were performed. As a result, they were clarified into 4 groups of independent clones.

[0015]

Clones #1, #6, #35 and #45 were representatives of each group having the longest lengths close to full length cDNAs, and base sequences of the clones were determined. Moreover, the deduced amino acid sequences encoded by the open reading frame regions of the base sequences were determined. The base sequences determined by sequencing were shown in Fig. 2. The base sequence of cDNA obtained on the clone #45 was shown in SEQ.ID. NO:2 in a Sequence List and in Fig. 2D. The region corresponding to open reading frame of said gene ranged from base numbers 32 to 1168, and the deduced amino acid sequence encoded by said region was shown in SEQ.ID. NO:1 in a Sequence List. Moreover, the base sequence of cDNA obtained on the clone #1 was shown in SEQ.ID. NO:4 in a Sequence List and in Fig. 2A. The region corresponding to open reading frame of said gene ranged from base numbers 14 to 1171, and the deduced amino acid sequence encoded by said region was shown in SEQ.ID. NO:3 in a Sequence List. Furthermore, the base sequence of cDNA obtained on the clone #6 was shown in SEQ.ID. NO:6 in a Sequence List and in Fig. 2B. The region corresponding to open reading frame of said gene ranged from base numbers 44 to 1201, and the deduced amino acid sequence encoded by said region was shown in SEQ.ID. NO:5 in a Sequence List. Moreover, the base sequence of cDNA obtained on the clone #35 was shown in SEQ.ID. NO:8 in a Sequence List and in Fig. 2C. The region corresponding to open reading frame of said gene ranged from base numbers 45 to 1163, and the deduced amino acid sequence encoded by said region was shown in SEQ.ID. NO:7 in a Sequence List. In the following, the gene corresponds the clone #45 was designated to MXMT1, the clone #1 was designated to MTL1, the clone # 6 was designated to MTL2, and the clone #35 was designated to MTL3, respectively.

[0016]

The alignment compared among amino acid sequences encoded by MXMT1, MTL1, MTL2 and MTL3 was shown in Fig. 3. As a result, it was shown that these four sequences exhibit extremely high homology. To confirm the functions charge by these polypeptides, genes corresponding to each clone were expressed in *E. coli* to confirm their enzymatic activities.

[0017]

(Expression of GST fused protein)

The open reading frame regions of MTL1 (Clone #1), MTL2 (Clone #6), MTL3 (Clone #35) and MXMT1 (Clone #45) were amplified by PCR (polymerase chain reaction). Then, they were optionally cloned into pGEX 4T-2 vector (Pharmacia) and *E. coli* (JM109) cells were transformed with the resulting plasmids. The obtained *E. coli* cells were cultured in LB liquid medium containing ampicillin. When OD600 of the culture reached to 0.5, IPTG (isopropyl thio- β -D-galactoside) was added to it and the final concentration of IPTG was made to 1 mM, then the mixture was further cultured at 16°C for 6 hours. *E. coli* was disrupted by a sonicator and the protein of the purpose was purified by glutathione Sepharose 4B as a GST (glutathione S-transferase) fusion protein. Concentration of the protein was measured by the Bradford method. Each of the GST fusion protein (500 ng) was separated by SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis), then it was stained by CBB (coumasie Brilliant Blue) to confirm purification. The purities of the resulting GST fusion proteins were analyzed by SDS-PAGE and the results were shown in Fig. 4. In Fig. 4, lane 1 shows the result of MTL2 fusion protein, lane 2 shows the result of MTL3 fusion protein, lane 3 shows the result of MXMT1 fusion protein, respectively. As a result, the resulting three fusion proteins were shown to be approximately pure.

[0018]

(Measurement of enzymatic activities by thin layer chromatography)

Measurement of enzymatic activity was performed using thin layer chromatography (TLC), based on the method of Kato et al. (Plant Physiol., 1996, 98, 629-636). In concrete, the reaction mixture of 100 μ l, containing 100 mM Tris-HCl (pH 7.5), 200 μ M substrate (xanthine, 7-methylxanthine, theobromine, paraxanthine, theophylline), 4 μ M 14 C-labeled S-adenosylmethionine, 200 μ M MgCl₂, 200 ng GST fusion protein, was incubated at 27°C for 2 hours. After the reaction, the resulting mixture was extracted with 1 ml of chloroform, the chloroform layer was recovered, then chloroform was evaporated by speed back concentrator. The residue was dissolved in 5 μ l of 50% methanol solution, then the solution was developed by TLC (solvent for development was water:acetic acid:n-butanol= 2:1:4, v/v/v). After the development, signal of radio activity was detected by image analyzer (Fuji BAS

2000). The result of enzymatic activity, which was measured on the fusion proteins derived from MTL2, MTL3 and MXMT1 using xanthine (X), 7-methylxanthine (7-Mx), theobromine (Tb), paraxanthine (Px) and theophylline (Tp) as the substrate, was shown in Fig. 5. From Fig. 5, it was revealed that the fusion protein derived from MXMT1 exhibited potent activity to synthesize theobromine, using 7-methylxanthine as the substrate. The fusion protein derived from MXMT1 also exhibited activity to synthesize caffeine, using paraxanthine as the substrate, but its relative activity was 15% of the above-mentioned activity. On the other hand, the fusion proteins derived from MTL2 and MTL3 did not exhibit activity as a methyl transferase, using the above-mentioned compounds as the substrate.

[0019]

(Enzymatic activity measurement and identification of the product by HPLC)

Using high performance liquid chromatography (HPLC), enzymatic activity of the MXMT1 fusion protein was measured and reaction product obtained from the enzymatic reaction was identified. The reaction mixture of 100 μ l, containing 100 mM Tris-HCl (pH 7.5), 200 μ M of substrate (7-methylxanthine, paraxanthine, theobromine), 50 μ M of S-adenosylmethionine, 200 μ M of $MgCl_2$, 200 ng of GST fusion protein, was incubated at 27°C for 2 hours. After incubation, the mixture was extracted with 1 ml of chloroform, the chloroform layer was recovered, then chloroform was evaporated by a speed back concentrator. The residue was dissolved in 50 μ l of 12% acetonitrile. Then the solution was fractionated by HPLC (Shodex Rspak DS-613 column) provided with UV detection system. As the solution for development, 12% acetonitrile was used and the signal was detected for absorbance of 254 nm.

[0020]

The result was shown in Fig. 6. The MXMT1 fusion protein was reacted with S-adenosylmethionine and 7-methylxanthine, which is the substrate and the reaction product was analyzed by HPLC. The chart exhibiting the result was shown in Fig. 6A. Moreover, theobromine was analyzed for a standard compound using HPLC and the chart exhibiting the result was shown in Fig. 6B. For preparation of negative standard, the MXMT1 fusion protein, S-adenosylmethionine and 7-methylxanthine was mixed and the reaction was immediately stopped and the chart exhibiting the result was shown in Fig. 6C. For standard products, 7-methylxanthine,



theobromine, paraxanthine and caffeine were analyzed by HPLC, and the chart exhibiting the result was shown in Fig. 6D. Furthermore, S-adenosylmethionine and 7-methylxanthine was reacted with MXMT1 fusion protein and then theobromine was added to the reaction mixture. The chart exhibiting the result was shown in Fig. 6E. The peak position of the reaction product detected in Fig. 6A coincided with the position of theobromine, which was analyzed as the standard compound. In addition, when theobromine was added to the enzymatic reaction mixture, only one peak was observed. Therefore, it was shown that theobromine was formed by enzymatic reaction of the MXMT1 fusion protein, using 7-methylxanthine as the substrate.

[0021]

According to the present invention, the polypeptide of theobromine synthase derived from coffea arabica and the gene encoding said polypeptide were provided. As theobromine synthase participates in biosynthesis of caffeine, caffeineless coffee would be obtained by preparing a transformed plant, wherein expression of gene encoding said enzyme was inhibited.

[0022]

[Sequence Listing]

<110> Applicant name: President of Nara Institute Science and Technology
<120> Title of invention: Theobromine synthase polypeptide of coffee plant and the gene encoding said polypeptide
<160> Number of sequences: 8
<210> Sequence number: 1
<211> Length of sequence: 378
<212> Type of sequence: Amino acid
<213> Organism: Coffea arabica
<400> Sequence

```
MELQEVLMHN EGE GDTSYAK NASYNLALAK VKPFLEQCIR ELLRANLPNI NKCIKVADLG 60
CASGPNTLLT VRDIVQSIDK VGQEEKNELE RPTIQIFLND LFQNDFNSVF KLLPSFYRKL 120
EKENGRKIGS CLISAMPGSF YGRLFPPEESM HFLHSCYSVH WLSQVPSGLV IELGIGANKG 180
SIYSSKGC RP PVQKAYLDQF TKDFTTFLRI HSKELFSRGR MLLTCICKVD EFDEPNPLDL 240
LDMAINDLIV EGLLEEEKLD SFNIPFFTPS AEEVKCIVEE EGSCEILYLE TFKAHYDAAF 300
SIDDDYPVRS HEQIKA EYVA SLIRSVYEPI LASHFGEAIM PDLFHLAKH AAKVLHMGKG 360
CYNLIISLA KKPEKSDV 378
```


<210> Sequence number: 2

<211> Length of sequence: 1298

<212> Type of sequence: Nucleic acid

<213> Organism: *Coffea arabica*

<400> Sequence



```
AGCAGTCGCA ATTCGATTGT CCTGCATATG AATGGAGCTC CAAGAAGTCC TGCATATGAA 60
TGAAGGTGAA GCGGATACAA GCTACGCCAA GAATGCATCC TACAATCTGG CTCTTGCCAA 120
GGTGAAACCT TTCCTTGAAC AATGCATACG AGAATTGTTG CGGGCCAACT TGCCCAACAT 180
CAACAAGTGC ATTAAAGTTG CGGATTGGG ATGCGCTTCT GGACCAAACA CACTTTTAAC 240
AGTGCGGGAC ATTGTGCAAA GTATTGACAA AGTTGGCCAG GAAGAGAAGA ATGAATTAGA 300
ACGTCCCACC ATTCAGATTT TTCTGAATGA TCTTTTCCAA AATGATTTC AATCGGTTTT 360
CAAGTTGCTG CCAAGCTTCT ACCGCAAACT CGAGAAAGAA AATGGACGCA AGATAGGATC 420
GTGCCAATA AGCGCAATGC CTGGCTCTTT CTACGGCAGA CTCTTCCCG AGGAGTCCAT 480
GCATTTTTTG CACTCTTGTT ACAGTGTTC TGGTTATCT CAGGTTCCCA GCGGTTTGGT 540
GATTGAATTG GGGATTGGTG CAAACAAAGG GAGTATTTAC TCTTCCAAAG GATGTCGTCC 600
GCCCGTCCAG AAGGCATATT TGGATCAATT TACGAAAGAT TTTACCACAT TTCTAAGGAT 660
TCATTCGAAA GAGTTGTTTT CACGTGGCCG AATGCTCCTT ACCTGCATTT GTAAAGTAGA 720
TGAATTCGAC GAACCGAATC CCCTAGACTT ACTTGACATG GCAATAAACG ACTTGATTGT 780
TGAGGGACTT CTGGAGGAAG AAAAATTGGA TAGTTTCAAT ATTCCATTCT TTACACCTTC 840
AGCAGAAGAA GTAAAGTGCA TAGTTGAGGA GGAAGGTTCT TCGGAAATTT TATATCTGGA 900
GACTTTTAAG GCCCATTATG ATGCTGCCTT CTCTATTGAT GATGATTACC CAGTAAGATC 960
CCATGAACAA ATTAAAGCAG AGTATGTGGC ATCATTAATT AGATCAGTTT ACGAACCCAT 1020
CCTCGCAAGT CATTTTGGAG AAGCTATTAT GCCTGACTTA TTCCACAGGC TTGCGAAGCA 1080
TGCAGCAAAG GTTCTCCACA TGGGCAAAGG CTGCTATAAT AATCTTATCA TTTCTCTCGC 1140
CAAAAAGCCA GAGAAGTCAG ACGTGTAATA GTTTGTTTTT AGTTGGTTTT TGTGCCGTTG 1200
GGGGTCTTTC GGGTATTGTC GTTTGTATT CGTAATAAAA GTGATGTGCA AGAATAAGAT 1260
ATTTAGTACA ATATTTTCAT AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA 1298
```

<210> Sequence number: 3

<211> Length of sequence: 385

<212> Type of sequence: Amino acid

<213> Organism: *Coffea arabica*

<400> Sequence

```
MELQEVLMN GGEGEASYAK NSSFNQLVLA KVKPVLEQCV RELLRANLPN INKCIKVADL 60
GCASGPNTLL TVWDTVQSID KVKQEMKNEL ERPTIQVFLT DLFQNDFNSV FMLLPSFYRK 120
LEKENG RKIG SCLIAAMPGS FHGRLFPEES MHFLHSSYSL QFLSQVPSGL VTELGITANK 180
RSIYSSKASP PPVQKAYLDQ FTKDFTTFLR MRSEELLSRG RMLLTICKG DECDGPNTMD 240
LLEMAINLV AEGRLGEEKL DSNVPIYTA SVEEVKCMVE EEGSFEILYL QTFKLRYDAG 300
FSIDDDCQVR SHSPVYSDEH ARAAHVASLI RSVYEPILAS HFGEAIIPDI FHRFATNAAK 360
VIRLGKGFYN NLIISLAKKP EKSDI 385
```

<210> Sequence number : 4

<211> Length of sequence: 1360

<212> Type of sequence: Nucleic acid

<213> Organism: *Coffea arabica*

<400> Sequence

```

GTCCTGCATA TGAATGGAGC TCCAAGAAGT CCTGCATATG AATGGAGGCG AAGGCGAAGC   60
AAGCTACGCC AAGAATTCAT CCTTCAATCA ACTGGTTCTC GCCAAGGTGA AACCTGTCCT   120
TGAACAATGC GTACGGGAAT TGTTCGGGGC CAACTTGCCC AACATCAACA AGTGCATTAA   180
AGTTGCAGAT TTGGGATGCG CTTCCGGACC AAACACACTT TTAACCGTTT GGGACACTGT   240
ACAAAGTATT GACAAAGTTA AGCAAGAAAT GAAGAATGAA TTAGAACGTC CCACCATTCA   300
GGTTTTTCTG ACTGATCTTT TCCAAAATGA TTTCAATTCG GTTTTCATGC TGCTGCCAAG   360
CTTCTACCGC AAAGTTGAGA AAGAAAATGG ACGCAAAATA GGATCGTGCC TAATAGCCGC   420
AATGCCTGGC TCTTCCACG GCAGACTCTT CCCCAGAGGAG TCCATGCATT TTTTACACTC   480
TTCTTACAGT CTTCAAGTTT TATCCCAGGT TCCCAGCGGT TTGGTGAAGT AATTGGGGAT   540
CACTGCGAAC AAAAGGAGCA TTTACTCTTC CAAAGCAAGT CCTCCGCCCG TCCAGAAGGC   600
ATATTTGGAT CAATTTACGA AAGATTTTAC CACATTTTTA AGGATGCGTT CGGAAGAGTT   660
GCTTTCACGT GGCCGAATGC TCCTTACTTG CATTGTGAAA GGAGATGAAT GCGACGGCCC   720
GAATACCATG GACTTACTTG AGATGGCAAT AAACGACTTG GTTGCTGAGG GACGTCTGGG   780
GGAAGAAAAA TTGGACAGTT TCAATGTTCC AATCTATACA GCTTCAGTAG AAGAAGTAAA   840
GTGCATGGTT GAGGAGGAAG GTTCTTTTGA AATTTTATAC TTGCAGACTT TTAAGCTCCG   900
TTATGATGCT GGCTTCTCTA TTGATGATGA TTGCCAAGTA AGATCCCATT CCCAGTATA   960
CAGCGATGAA CATGCTAGAG CAGCGCATGT GGCATCATT ATTAGATCAG TTTACGAACC  1020
CATCCTAGCA AGTCATTTTG GAGAAGCTAT TATACCTGAC ATATTCCACA GTTTTCGAC  1080
GAATGCAGCA AAGGTTATCC GCTTGGGCAA AGGCTTCTAT AATAATCTTA TCATTTCTCT  1140
TGCCAAAAAA CCAGAGAAGT CAGACATATA AAAGCTTGTT TTTAGTTGGT TTTTGTGTTA  1200
TGGGTTGTTT TCTGATACGG GGAAAGGATT CAGTGCGGTT GGGGTTCTAT CCGAGTATTG  1260
TACTTTTTAT ATTATTAGTT GGTGTATAAT TATTATGTTA CATTGTTATA TTCGTAATAA  1320
AAGTGACGTA CAAAAATAAA ATATTTTCAT AAAAAAAAAA                      1360
```

<210> Sequence number: 5

<211> Length of sequence: 385

<212> Type of sequence: Amino acid

<213> Organism: *Coffea arabica*

<400> Sequence

```
MELQEVLMN GGEGDASYAK NSSFNQLVLA KVKPVLEQCV GELLRANLPN INKCIKVADL 60
GCASGPNTLL TVRDIVQSID KVRQEMKNEL ERPTIQVFLT DLFQNDFNSV FMLLPSFYRK 120
LEKENGRKIG SCLIAAMPGS FHGRLFPPEES MHFLHSSYSL QFLSQVPSGL VTELGITANK 180
RSIYSSKASP PPVQKAYLDQ FTKDFTTFLR IRSEELLSRG RMLLTICKG DEFDPNTMD 240
LLEMAINDLV VEGHLEEEKL DSFNVPYIAA SVEELKCIVE EEGSFEILYL ETFKLRYDAG 300
FSIDDDCQVR SHSPEYSDEH ARAAHVASLL RSVYEPILAN HFGEAIIPDI FHRFATNAAK 360
VIRLGKGFYN NLIISLAKKP EKSDI 385
```

<210> Sequence number: 6

<211> Length of sequence: 1304

<212> Type of sequence: Nucleic acid

<213> Organism: *Coffea arabica*

<400> Sequence

```
TTTAGCAGTC CCAATTCGAT TTATGTACAA GTCCTGCATA TGAATGGAGC TCCAAGAAGT   60
CCTGCATATG AATGGAGGCG AAGGCGATGC AAGCTACGCC AAGAATTCAT CCTTCAATCA  120
ACTGGTTCTC GCCAAGGTGA AACCTGTCCT TGAACAATGC GTAGGGGAAT TGTTCGGGGC  180
CAACTTGCCC AACATCAACA AGTGCATTAA AGTTGCGGAT TTGGGATGCG CTTCCGGACC  240
AAACACACTT TTAACAGTTC GGGACATTGT ACAAAGTATT GACAAAGTTA GGCAAGAAAT  300
GAAGAATGAA TTAGAACGTC CCACCATTCA GGTTTTCTG ACTGATCTTT TCCAAAATGA  360
TTTCAATTCG GTTTCATGT TGCTGCCAAG TTTCTACCGC AAAGTTGAGA AAGAAAATGG  420
ACGCAAGATA GGATCGTGCC TAATAGCCGC AATGCCTGGC TCTTCCACG GCAGACTCTT  480
CCCCGAGGAG TCAATGCATT TTTTACACTC TTCTTACAGT CTTCAATTTT TATCCCAGGT  540
TCCCAGCGGT TTGGTGAAGT AATTGGGGAT CACTGCGAAC AAAAGGAGCA TTTACTCTTC  600
CAAAGCAAGT CCTCCGCCCG TCCAGAAGGC ATATTTGGAT CAATTTACGA AAGATTTTAC  660
CACATTTTTA AGGATTCGTT CGGAAGAGTT GCTTTCACGC GGCCGAATGC TCCTTACTTG  720
CATTTGCAAA GGAGATGAAT TCGACGGCCC GAATACCATG GACTTACTTG AGATGGCAAT  780
AAACGACTTG GTTGTGAGG GACATCTGGA GGAAGAAAAA TTGGACAGTT TCAATGTTCC  840
AATCTATGCA GCTTCAGTAG AAGAATTAAA GTGCATAGTT GAGGAGGAAG GTTCTTTTGA  900
AATTTTGTAC TTGGAGACTT TTAAGCTCCG TTATGATGCT GGCTTCTCTA TTGATGATGA  960
TTGCCAAGTA AGATCCCATT CCCCAAGATA CAGCGATGAA CATGCTAGAG CAGCGCATGT 1020
GGCATCATTA CTTAGATCAG TTTACGAACC CATCCTCGCA AATCATTTTG GAGAAGCTAT 1080
TATACCTGAC ATATTCCACA GGTTTGCGAC GAATGCAGCA AAGGTTATCC GCTTGGGCAA 1140
AGGCTTCTAT AATAATCTTA TCATTTCTCT TGCCAAAAAA CCAGAGAAGT CAGACATATA 1200
AAAGCTTGTT TATAGTTGGT TTTTGTGCTA TGGTTTGTTC TCTGATACGG GGAAAGGATT 1260
TAGTGCGGTT GGGGTTCAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAA                1304
```

<210> Sequence number: 7

<211> Length of sequence: 372

<212> Type of sequence: Amino acid

<213> Organism: *Coffea arabica*

<400> Sequence

```
MELQEVLRMN GEGDTSYAK NSAYNQLVLA VKKPVLEQCV RELLRANLPN INKCIKVADL 60
GCASGPNTLL TVRDIVQSID KVGQEKKNEL ERPTIQIFLN DLFPNDFNSV FKLLPSFYRK 120
LEKENGRKIG SCLIGAMPGS FYSRLFPEES MHFLHSCYCL QWLSQVPSGL VTELGISTNK 180
GSIYSSKASR LPVQKAYLDQ FTKDFTTFLR IHSEELFSHG RMLLTICKG VELDARNAID 240
LLEMAINDLV VEGHLEEEKL DSNLPVYIP SAEVVKCIVE EEGSFEILYL ETFKVLYDAG 300
FSIDDEHIKA EYVASSVRV YEPILASHFG EAIIPDIFHR FAKHAAKVLP LGKGFYNNLI 360
ISLAKKPEKS DV 372
```



<210> Sequence number: 8

<211> Length of sequence: 1316

<212> Type of sequence: Nucleic acid

<213> Organism: *Coffea arabica*

<400> Sequence

```
CTTTGGCAGT CCCAATTTGA TTTATGTACA AGTCCTGCAT ATGAATGGAG CTCCAAGAAG   60
TCCTGCGGAT GAATGGAGGC GAAGGCGATA CAAGCTACGC CAAGAATTCA GCCTACAATC  120
AACTGGTTCT CGCCAAGGTG AAACCTGTCC TTGAACAATG CGTACGGGAA TTGTTGCGGG  180
CCAACTTGCC CAACATCAAC AAGTGCATTA AAGTTGCGGA TTTGGGATGC GCTTCTGGAC  240
CAAACACACT TTTAACAGTT CGGGACATTG TCCAAAGTAT TGACAAAGTT GGCCAGGAAA  300
AGAAGAATGA ATTAGAACGT CCCACCATTG AGATTTTCTT GAATGATCTT TTCCCAAATG  360
ATTTCAAATC GGTTTTCAAG TTGCTGCCAA GCTTCTACCG CAACTTGAG AAAGAAAATG  420
GACGCAAAAT AGGATCGTGC CTAATAGGGG CAATGCCCGG CTCTTTCTAC AGCAGACTCT  480
TCCCCGAGGA GTCCATGCAT TTTTACACT CTGTGTTACTG TCTTCAATGG TTATCTCAGG  540
TTCCTAGCGG TTTGGTGACT GAATTGGGGA TCAGTACGAA CAAAGGGAGC ATTTACTCTT  600
CCAAAGCAAG TCGTCTGCCC GTCCAGAAGG CATATTTGGA TCAATTTACG AAAGATTTTA  660
CCACATTTCT AAGGATTCAT TCGGAAGAGT TGTTTTTACA TGGCCGAATG CTCCTTACTT  720
GCATTTGTAA AGGAGTTGAA TTAGACGCCC GGAATGCCAT AGACTTACTT GAGATGGCAA  780
TAAACGACTT GGTGTTGAG GGACATCTGG AGGAAGAAAA ATTGGATAGT TTCAATCTTC  840
CAGTCTATAT ACCTTCAGCA GAAGAAGTAA AGTGCATAGT TGAGGAGGAA GGTTCCTTTG  900
AAATTTTATA CCTGGAGACT TTAAAGGTCC TTTACGATGC TGGCTTCTCT ATTGACGATG  960
AACATATTAA AGCAGAGTAT GTTGCATCTT CCGTTAGAGC AGTTTACGAA CCCATCCTCG 1020
CAAGTCATTT TGGAGAAGCT ATTATACCTG ACATATTCCA CAGGTTTGCG AAGCATGCAG 1080
CAAAGGTTCT CCCCTTGGGC AAAGGCTTCT ATAATAATCT TATCATTTCT CTCGCCAAAA 1140
AGCCAGAGAA GTCAGACGTG TAAAAGTTG TTTTGTGTT GGGGAAAGGA ATAAGTGCCG 1200
TTGGGGGTCT TTCGGGTATT GTGCTTTTGA TATTATATTG TTTGTATCC GTAATAAAAG 1260
TGGTGTGTAA GAATAAGATA TTTGACATAT ATTATTTTCA AAAAAAAAAA AAAAAA   1316
```

[Brief description of the drawings]

[Fig 1]

Fig. 1 is a drawing showing the pathway of caffeine biosynthesis.

[Fig 2]

Fig. 2 is a drawing showing base sequences of cDNAs obtained from MTL1, MTL2, MTL3 and MXMT1.

[Fig 3]

Fig. 3 is a drawing showing alignment of amino acid sequences obtained from MXMT1, MTL2 and MTL3.

[Fig 4]

Fig. 4 is a photograph showing the results of SDS-PAGE analyses performed on fusion proteins obtained from MTL2, MTL3 and MXMT1.

[Fig 5]

Fig. 5 is a photograph showing the results of TLC to analyze enzymatic activities of the fusion proteins obtained from MTL2, MTL3 and MXMT1.

[Fig 6]

Fig. 6 is a chart showing the results of HPLC performed to identify reaction products in the enzymatic reaction mixture of the fusion protein obtained from MXMT1 identified by HPLC.

【書類名】

圖面

[Identification of Document] Drawing

【図 1】

Diagram illustrating the metabolic pathways of purine biosynthesis, showing the conversion of Guanosine to various methylxanthines and their subsequent metabolism.

Central Pathway:

- GMP → Guanosine
- Guanosine → Xanthosine (Ribose)
- Xanthosine → Xanthosine (Ribose-P)
- Xanthosine (Ribose-P) → XMP
- XMP → IMP (Ribose-P)
- IMP → AMP

Left Branch (Xanthine Pathway):

- Xanthine → 3-Methylxanthine (N-3)
- 3-Methylxanthine → 7-Methylxanthine (N-7)
- 7-Methylxanthine → 7-Methyl-XMP

Right Branch (Theophylline Pathway):

- Theophylline (N-7) → 3-Methylxanthine (N-3)
- 3-Methylxanthine (N-3) → 7-Methylxanthine (N-7)
- 7-Methylxanthine (N-7) → 7-Methyl-XMP

Other Pathways:

- Theophylline (N-7) → Theophylline (N-7)
- Theophylline (N-7) → Theophylline (N-7)
- Theophylline (N-7) → Theophylline (N-7)
- Theophylline (N-7) → Theophylline (N-7)

Chemical Structures:

- Xanthine: C1=NC2=C(N1)N=CN=C2=O
- 3-Methylxanthine: CN1C=NC2=C1C(=O)N(C)C(=O)N2C
- 7-Methylxanthine: CN1C=NC2=C1C(=O)N(C)C(=O)N2C
- Theophylline: CN1C=NC2=C1C(=O)N(C)C(=O)N2C
- Xanthosine: CN1C=NC2=C1C(=O)N(C)C(=O)N2C
- XMP: CN1C=NC2=C1C(=O)N(C)C(=O)N2C
- IMP: CN1C=NC2=C1C(=O)N(C)C(=O)N2C
- AMP: CN1C=NC2=C1C(=O)N(C)C(=O)N2C

【図2】
[Fig. 2]

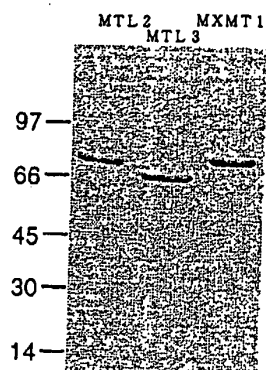
A	
GTCTGCATA TGAATGGAGC TCCAAGAAGT CTTGCATATG AATGGAGGCG AAGGCGAAGC AAGCTACGCC AAGAATTCAAT CTTCAATCA	90
ACTGGTCTC GCCAAGGTGA AACCTGTCTT TGAACAATGC GTACGGGAAT TGTTCGGGCG CAACCTTGCC AACATCAACA AGTGCAATTA	180
AGTTGCAGAT TGGGATGCG CTTCGGGACC AAACACACTT TTAACCTTT GGGACACTGT ACAAGATATT GACAAAGTTA AGCAAGAAAT	270
GAAGAATGAA TTAGAACGTC CCACCATTTA GGTTTTCTG ACTGATCTTT TCCAAGATGA TTCAATTGG GTTTTCATCG TGCTGCCAAG	360
CTTCTACGCG AAACCTGAGA AAGAAATGG ACACAAATA GATCGTGCC TAATAGCCGC AATGCTTGGC TCTTTCACG GCAGACTCTT	450
CCCGAGGAG TCCATGCATT TTTTACACTC TTCTACAGT CTTCAGTTT TATCCGAGT TCCAGCGGT TTGGTGACTG AATTGGGGAT	540
CACCTGGGAC AAAGGAGACA TTACTCTT CAAGCAAGT CTTCCGCGC TCCAGAAGGC ATATTGGAT CAATTACGA AAGATTTAC	630
CACATTTTAA AGGATGCGT CGGAAGATG GCTTTCAGT GCGGCAATGC TCCTTACTTG CATTTGTAAA GGAGATGAAT GCGAGGCGCC	720
GAATACCATG CACTTACTTG AGATGCAAT AAACGACTTG GTTGTGAGG GACGTCTGGG GGAAGAAAAA TTGGACAGT TCAATGTCC	810
AATCTATACA GCTTCAGTAG AGAAGTAAA GTGCATGGT GAGGAGGAG GTTCTTTTGA AATTTTATAC TTGCAGACTT TTAAGTCTCG	900
TTATGATGCT GGTCTCTCTA TTGATGATGA TTGCCAAGTA AGATCCCAT CCCAGTATA CAGCATGAA CATGCTAGG CAGCGCATGT	990
GGCATCATTA AATGATCAG TTACGAACC CATCTAGCA AGTCATTTT GAGAAGCTAT TATACCTGAC ATATTCCACA GGTTCGCAC	1080
GAATGCAGCA AAGGTATCC GCTTGGGCA AGGCTCTAT AATAATCTTA TCATTCTCT TGCACAAAAA CCAGAGAAGT CAGACATATA	1170
AAAGCTTGT TTATGTGT TTGTGTGTTA TGGGTGTGT TCTGATCGG GGAAGGATT CAGTGGGTT GGGGTCTAT CCGAGTATTG	1260
TACTTTTAT ATTATAGT GGTGTATAA TATTATGTTA CATTGTATA TTGTAATAA AAGTGACGTA CAAAAATAA ATATTTCAT	1350
AAAAAAAA	1360
B	
TTTACAGTC CCAATTCGAT TTATGTACAA GTCTGCATA TGAATGGAGC TCCAAGAAGT CTTGCATATG AATGGAGGCG AAGGCGATGC	90
AAGCTACGCC AAGAATTCAAT CTTCAATCA ACTGGTCTC GCCAAGGTGA AACCTGTCTT TGAACAATGC GTAGGGGAA TGTTCGGGCG	180
CAACTTGCCC AACATCAACA AGTGCAATTA AGTTGCGGAT TGGGATGCG CTTCGGGACC AAACACACTT TTAACGATT GGGACATTTG	270
ACAAAGTATT GACAAAGTTA GGAAGAAAT GAAGAATGAA TTAGAACGTC CCACCATTTA GGTTTTCTG ACTGATCTTT TCCAAGATGA	360
TTTCAATTGG GTTTTCATGT TGCTGCCAAG TTCTACGCG AAACCTGAGA AAGAAATGG ACCGAAGATA GATCGTGCC TAATAGCCGC	450
AATGCTGGC TCTTTCACG GCAGACTCTT CCGGAGGAG TCAATGCATT TTTTACACTC TTCTACAGT CTTCATTTT TATCCGAGT	540
TCCAGCGGT TTGGTGACTG AATTGGGGAT CACTGCGAAC AAAGGAGACA TTACTCTT CAAGCAAGT CTTCCGCGC TCCAGAAGGC	630
ATATTGGAT CAATTACGA AAGATTTTAC CACATTTTAA AGGATGCGT CGGAAGATG GCTTTCAGC GCGGCAATGC TCCTTACTTG	720
CATTTCGAAA GGAGATGAAT TCGACGCGCC GAATACCATG GACTTACTTG AGATGCAAT AAACGACTTG GTTGTGAGG GACATCTGGA	810
GGAAGAAAA TTGGACAGT TCAATGTTC AATCTATGA GCTTCAGTAG AAGAATTAAT GTGCATGTT GAGGAGGAG GTTCTTTTGA	900
GAATGTGATC TTGGAGACTT TTAAGCTCCG TTATGATGCT GGTCTCTCTA TTGATGATGA TTGCCAAGTA AGATGCCAAT CCCCAGATA	990
CAGCATGAA CATGCTAGG CAGCGCATGT GGCATCATTA CTAGATCAG TTACCAACC CATCTGCGA AATCATTTT GAGAAGCTAT	1080
TATACCTGAC ATATTCCACA GGTTTGEGAC GAATGCAGCA AAGGTATCC GCTTGGGCA AGGCTCTAT AATAATCTTA TCATTCTCT	1170
TGCCAAAAA CCAGAGAAGT CAGACATATA AAAGCTTGT TATAGTGTG TTTTGTGTA TGTGTGTGTT TCTGATACG GGAAGGATT	1260
TAGTGGGTT GGGGTCAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAA AAAA	1304
C	
CTTTCGCAAT CCAATTTGA TTATGTACAA AGTCTGCAT ATGAATGGAG CTCCAAGAAG TCTGCGGAT GAATGGAGCG AAGGCGGATA	90
CAGCTACGCC CAAAGATTTA GCTTCAATC AACTGTCTT CCGCAAGGTG AAACCTGTCC TGAACAATG CGTAGGGGAA TGTTCGGGCG	180
CAACTTGCCC AACATCAACA AAGTGCAATTA AGTTGCGGAT TGGGATGCG GTTCTGAGC CAACACACTT TTAACGATT GGGACATTTG	270
TCCAAGTATT TGAAGAATG GGGCAGGAAA AGAAGATGAA ATTGAAGCT CCCCACATTT AGATTTTCT GAATGATCTT TCCCCAATG	360
ATTCAATTC GTTTTCATGT TGCTGCCAAG TTCTACGCG AAACCTGAGA AAGAAATGG GAGCGAAAA AGATCGTGC CTAATGCGG	450
CAAGTCCGCG TCTTTCACG AGCAGCTCTT CCGGAGGAG TCAATGCATT TTTTACACTC CTGTACTG TCTTCAATG TTATCTCAGG	540
TTCTAGCGG TTGTGTGACT GAATGGGGA TCAATGCAAA CAAAGGAGC ATTACTCTT CCAAGCAAG TCGTCTGCGC GTCCAGAGG	630
CATATTGGA TCAATTTACG AAGATTTTAA CCAATTTCT AAGGATTCAT TCGGAAGAT TGTTTTCAAC TGCGCGAATG CTCTTACTT	720
GCATTTGAAA AGGATTTGAA TTAGACGCGC GGAATGCCAT AGACTTACTT GAGATGGCAA TAAACGACTT GGTGTGTGAG GGCATCTGG	810
AGGAAGAAA ATTGGATAGT TTCAATCTTC CAGTCTATAT ACCTTACGCA GAAGAAGTAA AGTGATAGT TGAGGAGGAA GGTCTTTTG	900
AAATTTTATA CTTGGAGACT TTAAGGTCC TTACGATGC TGGCTTCTCT ATTGACGATG AACATATTAA AGCAGATAT GTTGCATCTT	990
CCGTAGAGC AGTTACGAA CCACTCTCG CAGTCTATT TGGCAAGCT ATTATACCTG ACATATTCCA CAGTGTGEG AAGCATGCG	1080
CAAGGTCTT CCCCCTGGG AAAGGTCTT ATAAATCTT TATCATTTCT CTCGCCAAA AGCCAGAGAA GTGACAGTG TAAAGTTTG	1170
TTTTGTGTT GGGGAAAGG ATAAGTGCG TGGGGCTTC TTCGGTATT GTGCTTTTAA TATTATATTG TTTTGTATCC GTAATAAAG	1260
TGGTGTGAAA GAATAAGATA TTGACATAT ATTATTTTCA AAAAAAAAAA AAAAAA	1316
D	
AGCAGTCGCA ATTCGATTGT CTTGCATATG AATGCACTC CAAGAAGTCC TGCATATGAA TGAAGGTGAA GGCATACAA GCTACGCCAA	90
GAATGCATCC TACATCTGG CTCTTGCCA GGTGAACCT TTCTTGAAC AATGCATAG AGAATTGTT GGGGCCAAT TGCCCAACAT	180
CAACAAGTGC ATTAAGTTG CGGATTTGG ATGCTTCTT GGACCAACA CACTTTTAA AGTGGCGAC ATTGTGAAA GTATTGCAAA	270
AGTTGGCCAG GAAGAGAGA ATGAATTAGA ACCTCCACC ATTCAATTT TTCTGAATGA TCTTTTCCA AATGATTTC ATTCGGTTT	360
CAAGTCTGCT CCAAGTCTT ACCGCAACT CGAGAAGAA AATGGAGCA AGATAGGATC GTGCTAATA AGCGCAATGC CTGCTCTT	450
CTACGGCAGA CTCTTCCCG AGGAGTCAAT GCATTTTGG CACTCTGTT ACAGTGTTCA TTGGTATCT CAGGTTCGCA GCGGTTTGGT	540
GATTGAATG GGGATGGT CAAGCAAGG GAGTATTAC TCTTCAAAG GATGCTGCC CCGCTCCAG AAGGCATATT TGGATCAAT	630
TAGCAAGAT TTACCAATC TCTAAGGAT TCATTGAAA GAGTGTGTT CAGTGCGCG AATGCTCTT ACCTGCAATT GTAAAGTGA	720
TGAATTCGAC GAACCAATC CCTAGACTT ACTTGACAT GCAATAAGC ACTTGATTG TGAGGAGCT CTGGAGGAG AAAAAATGGA	810
TAGTTTCAAT ATTCCTATT TTACACTTC AGCAGAGCAA GTAAAGTGA TAGTTGAGG GGAAGTTCT TGGCAATTT TATATCTGGA	900
GACTTTAAG GCCCATTTG ATGCTGCTT CTCTATTGAT GATGATTACC CAGTAAGATC CCATGAACAA ATTAAGCAG AGTATGTGC	990
ATCATTAAT AGATCAGTT AGCAACCAT CTTGCAAGT CATTTTGGAG AAGCTATTAT GCTTGACTTA TTCCAGAGC TTGCGAAGCA	1080
TGCAGCAAG GTTCTCACA TGGCAAGG CTGCTATAA AATCTATCA TTCTCTGCG CAAAAAGCA GAGAAGTCA AGCTGATAAA	1170
GTTTGTGTT AGTGGGTT TGTGCGGTG GGGGTCTTC GGTATTGTC GTTTGTATT GCTAATAAA GTGATGCA AGAATAAGAT	1260
ATTATGACA ATATTTCAT AAAAAAAAAA AAAAAAAA	1298

【図3】

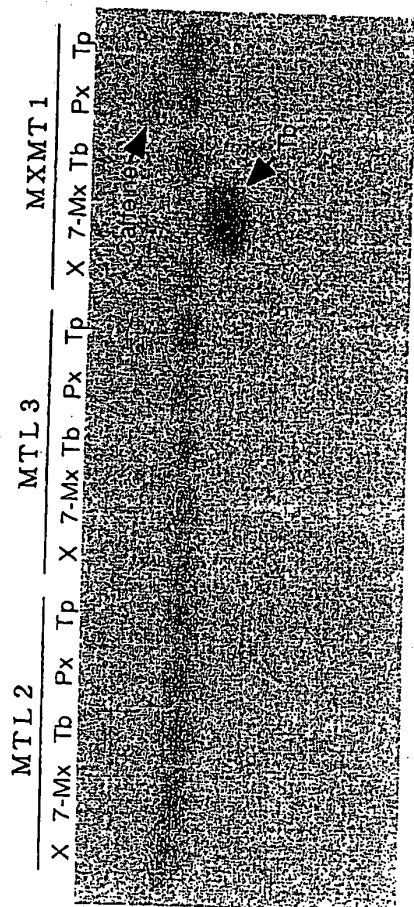
[Fig. 3]

MXMT1	MEIQEVLHMEGGGDTSYAKNASTN-LALAKVKPFLEQCIRELIRANLPN	49
MTL1G::EA::..S:F:Q:V::..V::V::.....	50
MTL2G::A::..S:F:Q:V::..V::VG::.....	50
MTL3R:G::.....SA::Q:V::..V::V::.....	50
MXMT1	INKCIKVALGCASGNILLIVRDIVOSTIKVGQPEKNELEPPTIQIFLN	99
MTL1W:T::..K::M::.....V::T	100
MTL2R::M::.....V::T	100
MTL3K::.....	100
MXMT1	DLFQNDNSVFKLLPSFYRKLEKNGRKIGSCLISAMPGSFYGRFPPEES	149
MTL1M::.....A::..H::.....	150
MTL2M::.....A::..H::.....	150
MTL3	...P::.....S::.....	150
MXMT1	MHFLHSCYSVHMLSCVPSGLVIELGIGANKGSTYSSKGRPPVQKAYLDQ	199
MTL1S::LQF::.....T::T::R::ASP::.....	200
MTL2S::LQF::.....T::T::R::ASP::.....	200
MTL3CLQ::.....T::ST::.....AS:L::.....	200
MXMT1	FKQFTFPLRIHSGELFSRGMLLTCICKVDEFDEPNPLDLLMADNLI	249
MTL1MR:E:L::.....G:C:G::TM::E::..V	250
MTL2R:E:L::.....G::G::TM::E::..V	250
MTL3E::H::.....GE:L:AR:AI::E::..V	250
MXMT1	VEGLLEEKLDSENLIPFFTPSAEEVKCIIVEEGSCETLYLEIFKAYDAA	299
MTL1	A::R:G::.....V:IY:A:V::..M::..F::..Q::LR::G	300
MTL2	..H::.....V:IYAA:V:L::.....F::.....LR::G	300
MTL3	..H::.....L:VYI::.....F::.....VL::G	300
MXMT1	FSIDDYPVRSH-----EQKAEVASLIRSVYEPILASHFGEADMPDL	343
MTL1CQ::..SPVYSD:HAR:AH::.....I::I	350
MTL2CQ::..SPEYSD:HAR:AH::..L::.....N::..I::I	350
MTL3EH-----.....SV:A::.....I::I	337
MXMT1	FHRLAKHAAKVLHMKGCYNLIISLAKKPERSDV	378
MTL1	..F:TN::..IRL::F::.....I	385
MTL2	..F:TN::..IRL::F::.....I	385
MTL3	..F::..FL::F::.....	372

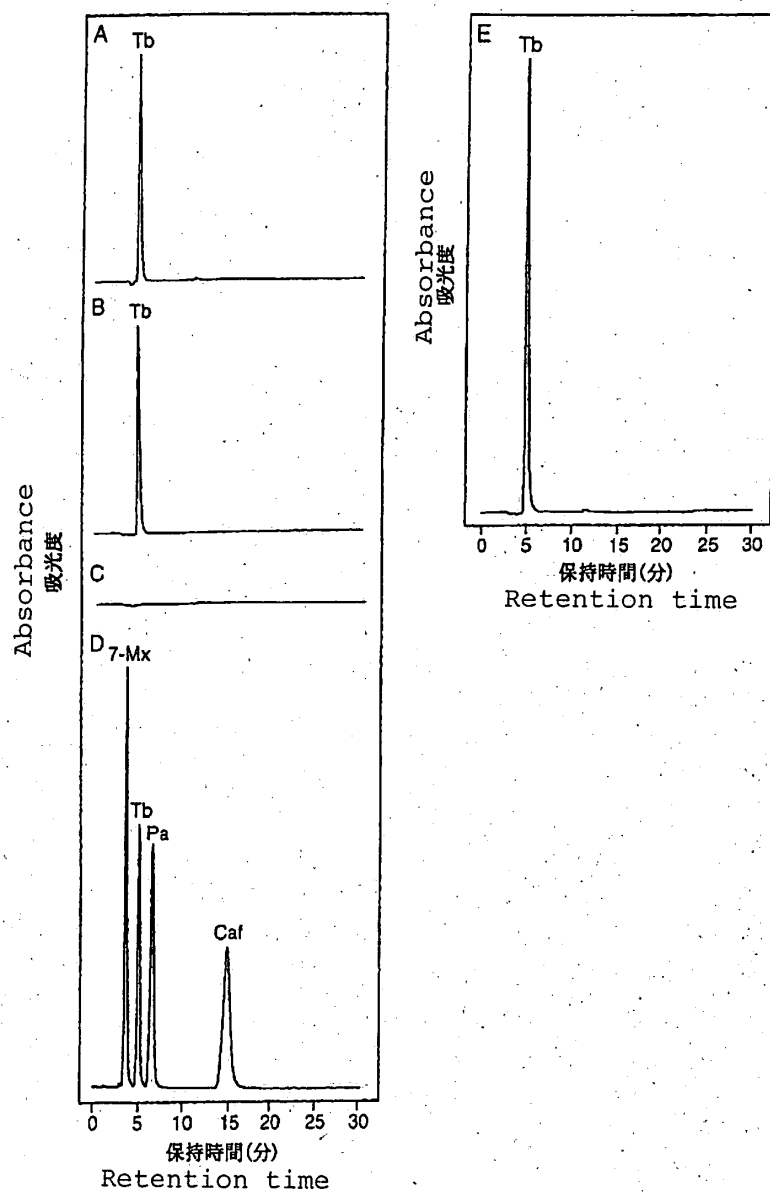
【図4】
[Fig. 4]



【図5】
[Fig. 5]



【図6】
[Fig. 6]



[Identification of Document] Abstract

[Abstract]

[Object]

The object of this invention is to isolate a gene participating in biosynthesis of caffeine for obtain a caffeineless coffee.

[Solving means]

According to the present invention, the polypeptide of theobromine synthase derived from *coffea arabica* and the gene encoding said polypeptide are provided. As theobromine synthase participates in biosynthesis of caffeine, caffeineless coffee would be obtained by preparing a transformed plant, wherein expression of gene encoding said enzyme is inhibited.

[Selected Figure] None